Bestimmung der PS II und PS I getriebenen Photophosphorylierungskapazität mit Hilfe der ATP-Pool-Messungen über den Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

MARLIES KIRSCHSTEIN

aus Kaufungen

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Bestimmung der PS II und PS I getriebenen Photophosphorylierungskapazität mit Hilfe der ATP-Pool-Messungen über den Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

MARLIES KIRSCHSTEIN

aus Kaufungen

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am : 13.7.1978
Tag der mündlichen Prüfung am : 11.8.1978
Berichterstatter : Prof.Dr.H.Senger
Mitberichterstatter : Prof.Dr.W.Urbach

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0026

INHALTSVERZEICHNIS Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	ALLGEMEINER TEIL	2
2.1.	Kopplungstheorien	2
2.1.1.	Chemische Kopplungstheorie	2
2.1.2.	Chemiosmotische Theorie	2
2.1.3.	Mikroosmotische Theorie	6
2.2.	Lichtabhängige ATP-Synthese	7
2.2.1.	Photosystem II getriebene Teilreaktion	9
2.2.2.	Photosystem I getriebene Teilreaktion	12
2.2.3.	Pseudozyklische Photophosphorylierung	19
2.3.	Hemmstoffe der Photophosphorylierung	21
2.3.1.	Antimycin A	21
2.3.2.	Natriumazid	24
2.3.3.	Stickstoff	25
3.	ZIELSETZUNG UND PROBLEMSTELLUNG	29
4.	METHODIK	31
4.1.	Objekt und Anzucht	31
4.2.	Bestimmung der Bezugsgrößen	32
4.3.	Herstellung von Chloroplastenpartikeln	33
4.4.	Polarographische Messung der Sauerstoffkonzentration	34
4.5.	Messung des CO_2-Gaswechsels	35
4.6.	Hemmstoffe	36
4.7.	ATP-Bestimmung an ganzen Algenzellen	37

Seite

4.7.1. Beschreibung von Meßmethode und Meßgerät 37
4.7.2. Versuchsanordnung zur ATP-Extraktion 40
4.7.3. Herstellung eines Reaktionsgemisches zur ATP-Messung 41
4.7.4. Verrechnung der Meßwerte 43
4.8. ADP-Bestimmung an ganzen Zellen 45

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION 47

5.1. Charakterisierung von Photosynthese und Atmung während des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii 47
5.1.1. Messung der Photosynthese-Kapazität und der PS II und PS I Aktivität 47
5.1.2. Messung der CO_2-Fixierung und der CO_2-Freisetzung 53
5.1.3. Wirkung von NaN_3 und Methylviologen auf die Atmung und die Photosynthese 58
5.2. ATP-Pool-Bestimmungen bei Chlamydomonas reinhardii 62
5.2.1. Einfluß verschiedener Begasungsmodalitäten auf die Änderung des ATP-Pools bei Belichtung 62
5.2.2. Simultane Messung der Änderung des ADP- und ATP-Pools beim Dunkel-Licht-Wechsel 67
5.2.3. Wirkung von Hemmstoffen auf den Dunkel-ATP-Pool 70

Seite

5.2.4. PS II getriebene Photophosphorylierung 74

5.2.4.1. Charakterisierung der PS II getriebenen Photophosphorylierung 74

5.2.4.2. Abhängigkeit der Größe des △ ATP-Wertes vom Entwicklungsstadium der Zellen 78

5.2.4.3. Abhängigkeit der Größe des △ ATP-Wertes von der Lichtintensität 82

5.2.4.4. Vergleich der gewonnenen Ergebnisse 82

5.2.5. Photosystem I getriebene Photophosphorylierung 85

5.2.5.1. Nachweis einer Photosystem I getriebenen zyklischen Photophosphorylierung unter aeroben Versuchsbedingungen 85

5.2.5.2. Hemmung der zyklischen Photophosphorylierung 89

5.2.5.3. Abhängigkeit der Größe des △ ATP-Wertes vom Entwicklungsstadium der Zellen 94

5.2.5.4. Abhängigkeit der Größe des △ ATP-Wertes von der Lichtintensität 96

5.2.5.5. Messung der Photosystem I getriebenen Photophosphorylierung unter anaeroben Versuchsbedingungen 98

5.2.5.6. Vergleich der unter anaeroben und unter aeroben Versuchsbedingungen gemessenen Photosystem I getriebenen Photophosphorylierung 104

		Seite
5.2.6.	Vergleich der unter aeroben Versuchsbedingungen gemessenen △ ATP-Werte der PS II und PS I getriebenen Photophosphorylierung	108
5.2.7.	Messung der Gesamt-Photophosphorylierung mit Methylviologen als Elektronenakzeptor	110
5.2.8.	Messung der Gesamt-Photophosphorylierung unter anaeroben Versuchsbedingungen	114
5.2.9.	Wirkung von Antimycin A auf die ATP-Pool-Änderung	117
5.2.10.	Messung des ATP-Spiegels während des Entwicklungs - zyklus	123
6.	SCHLUSSFOLGERUNG	126
7.	ZUSAMMENFASSUNG	130
8.	LITERATUR	133

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AA	Antimycin A
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Asc.	Ascorbat
cpm	counts per minute
Cyt b_{563}	Cytochrom b_{563}
DBMIB	2,5-Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-p-benzochinon
DCMU	3-(3,4-dichlorphenyl)-1,1-dimethyl-harnstoff
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
MV	Methylviologen
NADP	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NaN_3	Natriumazid
p-BQ	p-Benzochinon
PCV	packed cell volume
P_i	anorganisches Phosphat
PQ	Plastochinon
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
P_{700}^+	Chlorophyll a_I im Reaktionszentrum von Photosystem I (im oxidierten Zustand)
X^-	Primärakzeptor von Photosystem I (reduziert)

1. EINLEITUNG

Die primären Photosynthesevorgänge laufen im inneren Membransystem der Chloroplasten, den Thylakoidmembranen ab. Dort können Lichtquanten von den Pigmentkomplexen absorbiert werden und damit einen Elektronentransport gegen ein negatives Redoxpotential ingang setzen. Die grünen Pflanzen sind in der Lage, Lichtenergie zum Aufbau von Reduktionsäquivalenten in Form von $NADPH+H^+$ und freier Energie, in Form von ATP auszunutzen. Der Zusammenhang von photosynthetischem Elektronentransport und der Bildung von ATP wurde 1954 von ARNON erkannt. Beide Produkte, $NADPH+H^+$ und ATP, werden benötigt, um in einem sekundären Dunkelprozeß mit den in der Chloroplastenmatrix lokalisierten Enzymen des Calvinzyklus, CO_2 zu fixieren. Der Kopplungsmechanismus der membrangebundenen Redoxvorgänge mit der ebenfalls membrangebundenen ATP-Synthese aus ADP und P_i an der ATPase ist weiterhin Gegenstand intensiver Forschung.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Kopplungstheorien der Phosphorylierung

2.1.1. Chemische Kopplungstheorie

Die 1953 von SLATER für Mitochondrien entwickelte und 1967 von ihm auf die Verhältnisse an Chloroplasten übertragene chemische Kopplungstheorie besagt, daß die Energie der Elektronentransportkettenkomponenten (z.B. Plastochinon, Cytochrome) über kovalente Bindungen auf Zwischenprodukte übertragen wird. Damit werden diese befähigt, P_i anzulagern, das dann auf ADP übertragen werden kann. Die Theorie von SLATER (1953) hat sich in dieser einfachen Form als nicht länger brauchbar erwiesen, da sie für die nachweislich direkt mit dem Kopplungsmechanismus von photosynthetischem Elektronentransport und ATP-Synthese verbundenen Phänomene wie Ionenflux und Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über die Thylakoidmembran keine Erklärungsmöglichkeit bietet.

2.1.2. Chemiosmotische Theorie

MITCHELL (1961, 1966) stellte der chemischen Kopplungstheorie eine chemiosmotische Theorie für Mitochondrien entgegen, die von SCHLIEPHAKE et al. (1968) auf die Verhältnisse an Thylakoidmembranen übertragen wurde. Diese Hypothese besagt, daß der lichtgetriebene Elektronentransport der grünen Pflanzen vektorial über die Thylakoidmembran verläuft und einen transmembranen elektrischen Gradienten aufbaut, dem die Ausbildung eines pH-Gradienten folgt. Für diesen Vorgang wurde eine vesiculär geschlossene Membran gefor-

dert, die für H^+-Ionen impermeabel ist. Der Elektronentransport, der sowohl über Elektronencarrier (z.B. Cytochrome) als auch über Elektronen- und Protonencarrier (z.B. Plastochinon) verläuft, induziert eine aktive Protonentranslokation vom Thylakoidaußenraum in den Thylakoidinnenraum. In der Folge wird der Innenraum mit Protonen angereichert und die Membraninnenseite postitiv aufgeladen. Durch eine subsequente, passive Ionendiffusion wird der Aufbau einer übermäßigen Ladungsdifferenz verhindert (SCHRÖDER et al., 1972).

Das Zusammenwirken von Protonendifferenz und Ladungsdifferenz über die Thylakoidmembran wird definiert als protomotive force (pmf) und umschreibt den elektrochemisch aktiven Protonengradienten, der die treibende Kraft der ATP-Synthese darstellt (JAGENDORF, 1975). Der Protonengradient wird von der auf der Thylakoidaußenfläche lokalisierten ATPase als freie Energie genutzt. Durch eine rücklaufende Translokation der Protonen wird das elektrochemische Potential wieder abgebaut und dabei ATP gebildet. Während also die chemische Kopplungstheorie postuliert, daß die beim Elektronentransport frei werdende Energie chemisch gebunden wird, fordert die chemiosmotische Theorie den Aufbau eines transmembranen Protonengradienten als notwendige Voraussetzung zur Aktivierung der ATPase (MITCHELL, 1974, 1975 a,b). Viele der theoretischen Annahmen von MITCHELL konnten später experimentell an artifiziellen Membransystemen, Chloroplasten und ganzen Zellen, wie nachfolgend beschrieben, bestätigt werden.

Die Existenz eines Protonenflusses, den JAGENDORF und HIND (1963) als pH-Änderung im Medium

bei Belichtung von isolierten Chloroplasten erstmals beobachteten, ist ergänzt worden durch die Bestimmung des transmembranen pH-Gradienten an der Thylakoidmembran mit verschiedenen pH-Indikatoren (SCHULDIENER et al., 1972; ROTTENBERG et al., 1972; AUSLÄNDER und JUNGE, 1975; HELDT et al., 1973).Der lichtinduzierte Elektronentransport baut demnach im steady state eine pH-Differenz von 2-3 vom Thylakoidaußenraum (ca. pH 8) zum Thylakoidinnenraum (ca. pH 5) auf (HELDT et al., 1973; WERDAN et al., 1975; GAENSELER und McCARTY, 1971).

Die räumliche Anordnung der Komponenten der Elektronentransportkette in der Thylakoidmembran wurde mit Hilfe von Antikörperreaktionen, molekularen Sonden und hydrophilen bzw. lipophilen Donatoren und Akzeptoren des Elektronentransports bestimmt (TREBST, 1974). Die Ergebnisse führten zu der Aussage, daß die Photosysteme an der Thylakoidinnenseite, Plastochinon und der Elektronenakzeptor von PS I an der Thylakoidaußenseite gelagert sind (TREBST, 1974; SCHLIEPHAKE et al., 1968).

Membranpotentialbestimmungen an der Thylakoidmembran bei Blitzlichtversuchen ergeben, je nach angewandter Methode, Werte von 9 mV (ROTTENBERG et al., 1972; SCHRÖDER et al., 1972) bzw. 100 mV (SCHLIEPHAKE et al., 1968; BARBER, 1972). Es bleibt jedoch ungeklärt. ob dem Membranpotential, desen Abbau parallel zum pH-Gradientenaufbau verläuft (SCHRÖDER et al., 1972), eine Bedeutung bei der steady-state-Photophosphrylierung zukommt (RUMBERG und MUHLE, 1975; GRÄBER und WITT, 1974; JUNGE, 1977; ORT et al., 1976).

Das Wissen über die Wirkungsweise einer thylakoidgebundenen ATPase, die von AVRON (1963) erstmals beschrieben wurde, ist stark erweitert worden. Übersichtsartikel hierüber sind u.a. von JAGENDORF (1975) und NELSON (1976) abgefaßt worden. Bei der ATPase handelt es sich um ein membrangebundenes Enzym. Es nutzt, wie alle Redoxkettenabhängigen ATPasen, die in den Protonengradienten gespeicherte Energie aus zur Bildung von ATP.

ATP kann auch im Dunkeln unabhängig vom lichtinduzierten Elektronentransport gebildet werden. Dies wird erreicht durch künstlichen Aufbau eines Protonengradienten an der Thylakoidmembran einerseits mittels Säure-Base-Sprung (acid-base-jump) (NELSON, 1976; NELSON et al., 1971; JAGENDORF und URIBE, 1966), andererseits durch Redoxvorgänge, die durch lipophile Protonen- und Elektronendonatoren mit Ascorbat als Reduktionsmittel und Kaliumhexacyanoferrat (III) als Oxidationsmittel induziert werden (SELMAN und ORT, 1977).
Die Beobachtungen der Arbeitsgruppe um WITT (WITT et al., 1976) gehen dahin, daß die ATPase-Aktivität in Gang gesetzt werden kann, wenn die Chloroplasten einem pulsierenden elektrischen Feld (200 V, 30 msec) in wässriger Lösung ausgesetzt werden. Aufgrund dieser Versuche scheint die Annahme gerechtfertigt zu sein, daß in der Initialphase die beiden Komponenten des elektrochemischen Potentials, nämlich der Protonengradient und das Membranpotential, in ihrer Wirkungsweise bedingt austauschbar sind (JUNGE, 1977; GRÄBER und WITT, 1976).
MITCHELL (1961) postulierte einen transmembranen Aufbau des pH-Gradienten infolge des Elektonentransportes. Örtlich getrennt sollte an der Membran der Abbau und damit die Ausnutzung dieses

Gradienten zur ATP-Bildung erfolgen.
Der Zusammenhang von pH-Gradienten-Abbau und Protonierung der ATPase wurde mit dieser Hypothese jedoch nicht ausreichend erklärt. Die chemiosmotische Theorie bezüglich der Kopplung von photosynthetischem Elektronentransport und ATP-Synthese wurde zur mikro-chemiosmotischen Theorie erweitert.

2.1.3. Mikro-chemiosmotische Theorie

WILLIAMS postulierte bereits 1969, daß der photosynthetische Elektronentransport eine Ladungstrennung und damit eine Protonendelokalisation innerhalb der Thylakoidmembran hervorruft. Nicht ein transmembraner, sondern ein intramembraner Protonengradient wird demnach zur ATP-Synthese ausgenutzt (WILLIAMS, 1969, 1975).
Nach LYNN und STRAUB (1969a, b) sowie ROBERTSON und BOARDMAN (1975) soll die durch die Ladungstrennung entstandene Energie über die Protonen direkt auf die ATPase transferiert werden. Die ATPase würde somit durch den Elektronentransportvorgang selbst reduziert und protoniert.

Andere Arbeitsgruppen nehmen an, daß energieabhängige Konformationsänderungen in der Membran Änderungen am katalytischen Zentrum der ATPase hervorrufen und somit das Bindeglied zwischen Elektronentransport und Phosphorylierung darstellen (BOYER, 1975; GIAQUINTA et al., 1975; HARRIS und SLATER, 1975). Das Problem der örtlichen Trennung von Aufbau der freien Energie durch die Elektronentransportkette und der Nutzung durch die ATPase wäre damit aufgehoben.
Untersuchungen von ORT und DILLEY (1976), ORT et al. (1976) sowie SELMAN und ORT (1977) lassen den Schluß zu, daß die Acidifizierung des Thyla-

koidinnenraumes eher die Folge als die notwendige Voraussetzung eines ATP-Bildungsschrittes darstellt. Im Phosphorylierungs-steady-state führt die Delokalisation der Protonen in der Membran zur ATP-Bildung, d.h., daß die transportierten Protonen den Thylakoidinnenraum nicht erreichen, sondern, in Gegenwart von ADP und P_i, direkt ATP synthetisieren. Sofort nach Belichtung setzt an der ATPase die Bildung von ATP ein. Der Aufbau des pH-Gradienten über die Membran erfordert jedoch eine bestimmte Zeit. Dies ist nach der micro-chemiosmotischen Theorie jedoch kein Widerspruch. Nach dieser wird postuliert, daß nur bei zeitlicher Trennung von Elektronentransport und Photophosphorylierung eine Akkumulation der Protonen im Thylakoidinnenraum zu beobachten ist. JAGENDORF (1975) faßt diese erweiterte Hypothese dahingehend zusammen, daß die Funktion des durch den Elektronentransport induzierten energetischen Zustands der Thylakoidmembran darin besteht, als Intermediat zwischen Elektronentransport und ATP-Synthese zu fungieren.

2.2. Lichtabhängige ATP-Synthese

Zusammenfassende Artikel über Teilaspekte der mit dem photosynthetischen Elektronentransport gekoppelten Phosphorylierung sind in letzter Zeit in sehr ausführlicher Form verfaßt worden von BOYER et al. (1977), HALL (1976), HAUSKA und TREBST (1977), JAGENDORF (1975), JUNGE (1977), SIMONIS und URBACH (1973), REEVES und HALL (1978), TREBST (1974) und WITT (1976). Nach dem jetzigen Wissenstand sind sowohl der Elektronentransport über die gesamte Elektronentransportkette vom Wasser zum NADP, als auch die Teilreaktionen um PS I und PS II mit einer Phosphorylierung gekoppelt.

Nach vielen Kontroversen wird derzeit die Existenz zweier nativer Energiekonservierungsstellen postuliert, die je einem der beiden Photosysteme zuzuordnen sind.
Der Elektronentransport vom Wasser zum NADP kann sowohl in vitro an Chloroplastenpartikeln als auch in vivo an intakten Chloroplasten und ganzen Zellen in funktionelle Einheiten unterteilt werden, je nachdem welche Kombination von Elektronen-Donatoren bzw. -Akzeptoren und Hemmstoffen vorgegeben wird. Jeder Untereinheit ist eine Protonen freisetzende Komponente und ein Photosystem zuzuordnen (GRÄBER und WITT, 1976; HAUSKA und TREBST, 1977).
Die funktionelle Seite von PS II, die Wasserspaltung, und die funktionelle Seite von PS I, das Plastochinon, sind jeweils in der Lage, beim Redoxvorgang Protonen freizusetzen in den Thylakoidinnenraum. Sie entsprechen damit den von MITCHELL (1961) postulierten biochemischen Notwendigkeiten für eine Energiekonservierungsstelle. Es werden jedoch auch an den photosynthetischen Elektronentransport gekoppelte ATP-Bildungsstellen beschrieben, bei denen keine der beiden funktionellen Seiten der Photosysteme beteiligt ist. TREBST und seine Arbeitsgruppe (HAUSKA et al.,1974; HARTH et al., 1974) wiesen erstmals darauf hin, daß solche Energiekonservierungsstellen durch lipophile Substanzen, sog. class-III-Donatoren (SAHA et al., 1971), ausgebildet werden können, die beim Redoxvorgang durch die Elektronentransportkette auch Protonen freisetzen. Neben den physiologisch in der Thylakoidmembran vorkommenden Energiekonservierungsstellen (Wasserspaltung, Plastochinon) bauen diese Substanzen zusätzliche artifizielle Stellen auf (Abb. 1).

Einen wichtigen Aufschluß über die Gesamtphotophosphorylierung gibt das Verhältnis der gebildeten ATP-Mengen pro transportiertem Elektronenpaar (P/e_2) an. Aufgrund verschiedener Verrechnungsmodi wird sowohl ein P/e_2 Wert von 1 (IZAWA et al., 1974; TREBST, 1974) als auch ein solcher von 2 (HALL, 1976) beschrieben. Dabei wird jeder der beiden nativen Energiekonservierungsstellen,d.h., der Wasserspaltung und dem Plastochinon, die Hälfte des Gesamt P/e_2 Wertes zugeschrieben. Eine Auflistung der mit verschiedenen Akzeptor- und Donator-Systemen gemessenen P/e_2 Werte ist bei HALL (1976), HAUSKA und TREBST (1977) sowie REEVES und HALL (1978) zu finden.

2.2.1. Photosystem II getriebene Teilreaktion

Nach Einführung des Hemmstoffs DBMIB (TREBST et al., 1970) war es möglich, eine dem PS II zuzuordnende Energiekonservierungsstelle eindeutig nachzuweisen. DBMIB wird als kompetitiver Hemmstoff von Plastochinon angesehen, der die Reoxidation von Plastochinon durch Cytochrom f bzw. Plastocyanin verhindert (BÖHME et al., 1970). Nach Unterbrechung des Elektronentransportes von PS II zu PS I am Plastochinon kann nach Zugabe geeigneter Elektronenakzeptoren von PS II die Wasserspaltung wieder aktiviert werden. Auf diese Weise ist ein von PS II vermittelter Elektronenfluß aufrecht zu erhalten. Als Elektronenakzeptoren werden Phenylendiamin (PD), N-Tetramethyl-p-phenylendiamin (TMPD), Diaminoduren (DAD) und p-Benzochinon verwendet (CURTIS et al., 1975; GIMMLER, 1973; GOULD und IZAWA, 1973; IZAWA et al. 1973; QUITRAKUL und IZAWA, 1973; SAHA et al., 1971; TREBST und REIMERS, 1973; TREBST, 1975).
In Chloroplastenpartikeln ist es möglich, auch DCPIP und Kaliumhexacyanoferrat (III), die bei intakten Chloroplasten eher nach PS I angreifen, als Elektronenakzeptor vor dem Plastochinon

einzusetzen (TREBST, 1974).
Für p-Benzochinon als Hill-Reagenz ist bekannt, daß es auch ohne Zugabe von DBMIB oder Kaliumcyanid den Elektronentransport zum PS I unterbindet (SENGER, 1968).
Wie dem Elektronentransport von Wasser zu NADP, so wird auch der von PS II getriebenen Teilreak - tion von der Wasserspaltung bis zum Hill-Reagenz der Aufbau eines Membranpotentials (JUNGE, 1977; SCHLIEPHAKE et al., 1968) mit sich anschließendem Aufbau eines Protonengradienten zugeordnet (BÖHME und TREBST, 1969; GRÄBER und WITT,1975; IZAWA et al., 1973; TREBST und REIMERS, 1973). Die Werte sind jedoch nur halb so groß wie diejenigen, welche bei der Aktivierung der gesamten Elektronentransportkette erhalten werden.
Versuche mit den verschiedenen Hill-Reagenzien beschreiben für die von PS II getriebene protomotive force eine vergleichbare ATP-Bildungskapazität. Eine Auflistung der Werte verschiedener Arbeitsgruppen ist bei HALL (1976) und HAUSKA und TREBST (1977) zu finden. Der P/e_2 Quotient beträgt für die Hill-Reaktion mit Chloroplasten durchschnittlich 0,3 - 0,5 . Für jede native Kopplungsstelle wird theoretische ein Quotient von 0,5 bzw. 1 (HALL, 1976; IZAWA et al., 1974; GÄBER und WITT, 1976) gefordert. Der PS II getriebenen Phosphorylierungsrate muß deshalb eine geringere Kopplungseffizienz zugeschrieben werden (GOULD und IZAWA, 1974). Weiterhin charakteristisch für die mit der Wasserspaltung gekoppelten ATP-Bildungsrate soll ihre pH-Unabhängigkeit im Bereich von pH 6 bis 9 und die nicht vorhandene Wirkung von ADP und P_i sowie von Entkopplern auf den P/e_2 Quotienten (GOULD und IZAWA, 1974) sein. COHEN et al., (1975) beschreibt demgegenüber für PS II in Chloroplasten eine vom pH

des Thylakoidinnenraumes abhängige ATP-Bildung, die entkoppelbar ist.

Unter Versuchsbedingungen, welche die Wasserspaltung von Chloroplasten unterbinden, wie DCMU-Zugabe, Triswäsche und Hitzebehandlung (YAMASHITA und BUTLER, 1968 a,b), ist keine ATP-Bildung unter Zugabe eines PS II-Akzeptors meßbar. Ersetzt man die Elektronendonatorfunktion des Wassers durch reine Elektronendonatoren, z.B. N-tetramethyl-p-phenylendiamin (TMPD) (SELMAN und ORT, 1977) oder Silicomolybdat (GIAQUINTA et al., 1973), so ist zwar ein Elektronenfluß zu den Hill-Reagenzien meßbar, dieser induziert jedoch keine ATP-Bildung. Lipophile Elektronen- und Protonen-Donatoren, die durch PS II oxidierbar sind, wie Phenylendiamin (PD), Diaminodurene (DAD), Dichlorphenolindophenol (DCPIP), Benzidin (HARTH et al., 1974; IZAWA und ORT, 1974; SELMAN und ORT, 1977, YAMASHITA und BUTLER, 1968) können dagegen neben dem Elektronentransport auch eine ATP-Bildung induzieren, die DCMU-hemmbar ist. Sie bilden somit artifizielle Energiekonservierungsstellen aus (HARTH et al., 1974). YOCCUM (1977a, b) beschreibt jedoch sowohl mit dem Elektronen- und Protonen-Donator PD, als auch mit dem Elektronen-Donator TMPD, der keinen Protonentransport über die Membran vornehmen kann, einen DCMU-sensitiven, bedingt DBMIB- und Antimycin A-sensitiven zyklischen Elektronentransport um PS II mit einem P/e_2-Quotienten von 0,2.
Die durch den Elektronentransport von der Wasserspaltung zu den verschiedenen Hill-Reagenzien verursachte ATP-Bildung wird als DCMU-sensitiv und DBMIB-insensitiv beschrieben (GOULD und IZAWA, 1973; IZAWA et al., 1973). Plastochinon, welches als geschwindigkeitsbestimmender Schritt des Elektronentransports dis-

kutiert wird (SENGER und FRICKEL-FAULSTICH, 1974; STIEHL und WITT, 1969) soll aufgrund der DBMIB-Insensitivität der Hill-Reaktion nicht an dem Aufbau der promotive force um PS II beteiligt sein (IZAWA et al., 1973).

Der genaue Angriffspunkt von p-Benzochinon in der Elektronentransportkette ist nicht bekannt, sollte aber nach dem Plastochinon-Reduktanden und vor dessen Oxidanden liegen. Da die Reoxidation des Plastochinons als pH-abhängiger, geschwindigkeitsbestimmender Schritt beschrieben wird, die Hill-Reaktion mit p-Benzochinon aber ebenfalls eine,wenn auch nur geringfügige pH-abhängige Aktivität zeigt, kann man eine Reduktion von Plastochinon während der Hill-Reaktion nicht ohne weiteres ausschließen(BRAND et al., 1975; Curtis et al., 1975; MELL, 1977).

2.2.3. Photosystem I getriebene Teilreation

Nach Hemmung der Wasserspaltung ergibt sich die Möglichkeit, die mit dem Elektronentransport um PS I gekoppelte Photophosphorylierung gesondert zu untersuchen. Zwei unterschiedliche Transportwege können von den Elektronen durchlaufen werden. Einmal ist in vitro mit Elektronendonatoren ein nicht-zyklischer Elektronentransport induzierbar, bei dem je nach Intaktheit des Chloroplasten, NADP, Sauerstoff, Methylviologen oder Kaliumhexacyanoferrat (III) als native bzw. artifizielle Elektronenakzeptoren nach PS I fungieren können. Des weiteren ist ein zyklischer Elektronentransport um PS I in vivo oder mit Cofaktoren in vitro meßbar.

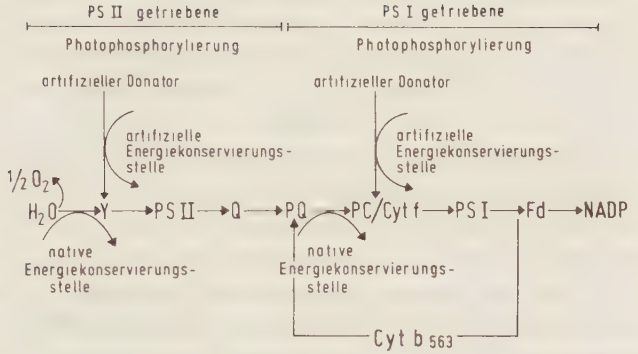

Abb. 1: Schema der Energiekonservierungsstellen des zyklischen und nicht-zyklischen Elektronentransportes sowie der artifiziellen Elektronendonatorsysteme für PS I und PS II.
Die nativen Energiekonservierungsstellen schließen je ein Photosystem und eine Protonen-freisetzende Stelle auf der Thylakoidinnenseite ein (Plastochinon, Wasserspaltung). Die artifiziellen Energiekonservierungsstellen schließen je ein Photosystem mit einem artifiziellen Elektronendonator ein, der in den Thylakoidinnenraum Protonen freisetzt (verändert nach HARTH et al., 1974).

Die Donatoren des nicht-zyklischen Elektronentransports reduzieren die Elektronentransportkette zwischen PS II und PS I. Reine Elektronendonatoren wie N-tetramethyl-p-phenylendiamin (TMPD) und Pentamethylindiamin können lediglich einen Elektronentransport, jedoch keine ATP-Bildung auslösen (HAUSKA et al., 1975; OETTMEIER et al., 1974).
Donatoren, die sowohl Elektronen als auch Protonen abgeben, bedingen demgegenüber einen mit der ATP-Bildung gekoppelten Elektronenfluß. Oft verwendete Cofaktoren der ATP-Bildung sind DCPIP (BRADEEN und WINGET, 1974; NEUMANN et al., 1971), Diaminodurene (DAD) (BRADEEN, 1974; GIMMLER, 1973; IZAWA et al., 1973),Phenylendiamin (PD) (HEATHCOTE und HALL, 1974; YAMASHITA und BUTLER, 1968). Zusätzlich zugesetztes Ascorbat hält die Elektronen-Donatoren dabei jeweils in reduziertem Zustand.

Bei Versuchen mit den oben angeführten Cofaktoren geht man von der Annahme aus, daß zusätzlich zum Plastochinon eine zweite Kopplungsstelle im nicht-zyklischen Elektronentransport nach der Wasserspaltung existiert, da diese PS I getriebenen Photophosphorylierungen DCMU und DBMIB insensitiv sind, jedoch auf Entkoppler ansprechen.
Die nach Plastochinon gelegene zweite Energiekonservierungsstelle ist nach TREBST (1974) als artifiziell zu bezeichnen (vgl. Abb. 1).

SELMAN und ORT (1977) konnten eine ATP-Bildung im Dunkeln nachweisen, die mit einem Elektronentransport gekoppelt ist vom Ascorbat über Class-III-Donatoren und Teile der Elektronentransportkette inclusive PS I zu Kaliumhexacyanoferrat (III).

Nach Ausschaltung der Wasserspaltung kann an Algenzellen und intakten Chloroplasten höherer Pflanzen eine ATP-Bildung gemessen werden, die durch einen zyklischen Elektronentransport um PS I verursacht wird.
Es besteht Einigkeit darüber, daß PS I, P_{700}^{+} und X^{-} essentielle Komponenten des nicht-zyklischen als auch des zyklischen Elektronentransportes sind (BIGGINS, 1974). Es ist jedoch schwierig, weitere Komponenten der zyklischen Elektronentransportkette als definitiv festzulegen, da durch zugesetzte Redoxreagentien sehr verschiedene Transportwege möglich werden.
Die Hemmbarkeit der zyklischen Photophosphorylierung intakter Algen durch DBMIB läßt jedoch die Annahme zu, daß Plastochinon die katalytische Komponente der nativen Konservierungsstelle um PS I ist (BIGGINS, 1974; BÖHME et al., 1971; SCHÄFER, 1975; URBACH und KAISER, 1972). Somit würden der nicht-zyklische und der zyklische Elektronentransport ab Plastochinon über dieselben Redoxkettenglieder verlaufen. Dieser Phosphorylierung ist eine Energiekonservierungsstelle zuzuordnen, welche die Hälfte des beim nicht-zyklischen Elektronentransport vom Wasser zum NADP gemessenen Membranpotentials und Protonengradienten aufbaut, mit einem P/e_2-Wert von 0,5 bzw. 1 (GRÄBER und WITT, 1976; HALL, 1976; SCHLIEPHAKE et al., 1968; TREBST, 1974).

Es werden aber auch zyklische Phophorylierungsschritte beschrieben, bei denen Plastochinon nicht beteiligt ist. Cofaktoren eines solchen DBMIB-insensitiven, Kaliumcyanid-sensitiven Elektronentransportes sind Diaminodurene und DCPIP (Übersicht siehe HALL, 1976; HAUSKA und TREBST, 1977). Diese Cofaktoren werden nach Plastochinon und vor Plastocyanin oxidiert. Ein DBMIB-insensitiver,

nur bedingt Kaliumcyanid sensitiver Cofaktor der zyklischen Photophosphorylierung ist 5-Methylphenaziniummethylsulfat (PMS). Es wird angenommen, daß PMS nahe PS I oder möglicherweise direkt von P_{700}^+ oxidiert werden kann und so einen Elektronentransport ingang setzt, der wesentliche Teile der nativen Kette umgeht. Die hohe Lichtsättigung der ATP-Bildung und die hohe turn-over Rate des PMS-katalysierten Elektronentransportes würde sich damit erklären lassen (NEUMANN et al., 1971). KYLIN et al. (1974) diskutieren sogar zwei verschiedene zyklische Elektronentransportsysteme mit je einer Energiekonservierungsstelle. Eine spätere Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe (SUNDBERG et al ., 1976) interpretiert diese Arbeitshypothese jedoch neu.
Die Beobachtung, daß die nicht-zyklische Photophosphorylierung durch geringere Konzentrationen von DBMIB hemmbar ist als die zyklische Photophosphorylierung, hat zu der Annahme geführt, daß Plastochinon gar nicht (FORTI und ROSA, 1971) bzw. mit verschiedenen Anteilen am zyklischen Elektronentransport beteiligt ist (SUNDBERG et al., 1976).
Als weitere Komponente des zyklischen Elektronentransportweges wird Cyt b_{563} diskutiert. Hemmstoffversuche mit Antimycin A an einer Chlamydomonas - Mutante (HIYAMA et al., 1970) geben Hinweis darauf, daß Cyt b_{563} sowohl in der Atmungskette, als auch beim zyklischen Elektronentransport eine Rolle spielt. ARNON et al., (1967) weisen nach, daß Cyt b_{563} im Elektronentransport der Kaliumhexacyanoferrat (III) katalysierten zyklischen Photophosphorylierung beteiligt ist. Neuere Veröffentlichungen bestätigen diese Funktion von Cyt b_{563}, schliessen seine Beteiligung am Elektronentransport um PS II jedoch nicht aus (AMESZ et al., 1972;

BÖHME und CRAMER, 1972;HEBER et al.,1976; HIND 1968; LARKUM und BONNER,1972). Es ist ebenfalls nachgewiesen, (BÖHME und CRAMER, 1972) daß nach Zugabe von DBMIB, die Reoxidation von Cyt. b_{563} durch Plastochinon gehemmt wird.
Dem stehen Versuche von BOTHE (1969) und FORTI und ROSA (1971)entgegen, die aufgrund von Hemmstoffversuchen mit Antimycin A eine Beteiligung von Cyt b_{563} am zyklischen Elektronentransport ausschließen.

Eine nicht durch Cofaktoren substituierte zyklische Photophosphorylierung ist für Chloroplastenpartikel nicht nachgewiesen worden und kann in intakten Chloroplasten in nur sehr geringer Rate ablaufen (FORTI und ROSA 1971;KAISER und URBACH,1973). Keine Probleme bestehen dagegen beim Nachweis der zyklischen Photophosphorylierung an intakten Algen unter anaeroben Versuchsbedingungen für Elodea densa (JESCHKE und SIMONIS,1969),Dunaliella parva (GIMMLER, 1973), Scenedesmus obliquus (KYLIN et al 1974;SCHÄFER,1975),Ankistrodesmus braunii (ULLRICH und SIMONIS,1969), Anacystis nidulans (IMAFUKU,1976) sowie unter aeroben Versuchsbedingungen für Anacystis nidulans (BORNEFELD et al.,1972), Chlorella pyrenoidosa und Synechococcus lividus (BEDELL und GOVINDJEE,1973; LEWENSTEIN und BACHOFEN, 1973). Versuche zur zyklischen Photophosphorylierung werden sehr häufig unter Stickstoffbegasung durchgeführt, um möglichst in sauerstoffreiem Milieu arbeiten zu können. HEBER (1969) wies für Chloroplasten nach, daß Sauerstoff eine größere Affinität zu den von PS I angeregten Elektronen hat, als der primäre Akzeptor der zyklischen Elektronentransportkette. Eine unter anaeroben Bedingungen meßbarer zyklischer Elektronentransport wird (s.HEBER,1969) unter aeroben Bedingungen durch einen pseudozyklischen

Elektronentransport ersetzt.
Kohlendioxid- und Sauerstoff-freie Begasung soll sowohl den pseodozyklischen als auch den nicht-zyklischen Elektronentransport unterbinden und die Atmung drosseln. Letzteres ist zur Messung des ATP-Pools von Grünalgen häufig erforderlich. Diese bauen nämlich im Dunkeln einen sehr hohen ATP-Pool auf, der bei Belichtung auf ein niedrigeres Niveau abfällt (BEDELL und GONVINDJEE, 1973; SCHÄFER, 1975; URBACH und GIMMLER, 1970 a). Negative Licht-minus-Dunkel-Werte ($\triangle$ ATP-Werte) machen eine Bewertung der Phosphorylierungsraten jedoch unmöglich. Es steht demnach außer Frage, daß im Gegensatz zu Versuchen mit Chloroplasten, in intakten Algen eine zyklischen Photophosphorylierung nach Ausschaltung des nicht-zyklischen Elektronentransports durch Stickstoffbegasung, Hemmstoffe oder Anregungslicht von PS I meßbar ist. Ungeklärt bleibt die physiologische Relevanz dieser Phosphorylierungskapazität. Die Photokinese (NULTSCH,1967), die Inkorporation von ^{32}P in Zellbestandteile (URBACH und GIMMLER, 1970 b) und die anaerobe Photoassimilation von Glucose (TANNER et al., 1969; WIESSNER, 1970) können als Indikator einer zyklischen Photophosphorylierung in vivo angesehen werden.
Eine Bereitstellung von ATP aus der zyklischen Photophosphorylierung für die CO_2-Fixierung wird ebenfalls diskutiert.
Während Schürmann et al.(1971) für Chloroplasten nachwiesen, daß die Antimycin A hemmbare zyklische Photophosphorylierung essentiell an der CO_2-Fixierung beteiligt ist, streiten KANDLER und TANNER (1966) diese Funktion ab, da beide Prozesse bei verschiedenen Lichtintensitäten gesättigt sind. KLOB et al. (1973) beobachteten, daß die zyklische Photophosphorylierung eine wesentliche Bedeutung für das Funktionieren

des Calvinzyklus in der Initialphase der CO_2-Fixierung hat. Zu diesem Zeitpunkt soll die suboptimal ablaufende, nicht-zyklische Photophosphorylierung durch ATP aus der oxidativen Phosphorylierung oder der zyklischen Photophosphorylierung substituiert werden. Ein Funktionieren der zyklischen Photophosphorylierung während der steady state CO_2-Fixierung wird dabei jedoch ausgeschlossen. Aufgrund der langsamen turn-over Rate von P_{700}^+ schließt MAXWELL (1976), daß bei hohen Lichtintensitäten der zyklischen Photophosphorylierung bei der Bereitstellung von "extra" ATP keine Bedeutung zukommen kann.
Für photosynthetische Bakterien (BALTSCHEFFSKY et al., 1971) und blaugrüne Algen (BEDELL und GOVINDJEE, 1973; BORNEFELD et al., 1972) wurde nachgewiesen, daß ein physiologisch relevanter Anteil des ATP-Pools durch die zyklische Photophorylierung gebildet wird.

2.2.3. Pseudozyklische Photophosphorylierung

Während des pseudozyklischen Elektronentransportes, den erstmals MEHLER (1951) an Chloroplastenpartikeln beschrieb, kann, bei Mangel von NADP, Sauerstoff als Elektronenakzeptor nach PS I fungieren und zum Superoxid (H_2O_2) reduziert werden. Nicht-zyklischer und pseudozyklischer Elektronentransport-Weg unterscheiden sich bis auf den Endakzeptor nicht voneinander. Der mit der sogenannten Mehler-Reaktion gekoppelten ATP-Bildung wird die Funktion zugeschrieben, den Calvinzyklus mit ausreichenden Mengen an ATP zur CO_2-Fixierung zu versorgen, und zwar sowohl in der Initialphase (JENNINGS, 1972),

als auch während des steady-state (EGNEUS et al., 1975). Das gebildete Superoxid wird als sehr reaktives Zellgift bei intakten Zellen sofort durch die Katalase abgebaut und entzieht sich damit der Meßbarkeit.
Da pseudozyklischer und nicht-zyklischer Elektronentransport denselben Reaktionsmechanismen unterliegen und mit denselben Substanzen (DCMU, DBMIB, Kaliumcyanid) hemmbar sind, können beide nur unter großem Aufwand unabhängig voneinander bestimmt werden.
Die zunächst nur an Chloroplastenpartikeln beobachtete Funktion des Sauerstoffs als Hill-Reagenz, konnte später auch bei intakten Chloroplasten beobachtet werden (EGNEUS et al, 1975; FORTI und ROSA, 1977; HEBER, 1973). PATTERSON und MEYERS (1973) haben auch an ganzen Zellen von Anacystis nidulans, nicht jedoch an Chlorella pyrenoidosa eine durch den pseudozyklischen Elektronentransport verursachte Superoxid (H_2O_2)-Bildung gemessen.
AVRON (1966) und HEBER (1969) haben ein Modell für die Regulation der drei möglichen Photosynthese-getriebenen Phosphorylierungsschritte entwickelt. Danach werden bei Belichtung aufgrund der Affinitätsverhältnisse, die aus der Wasserspaltung stammenden Elektronen zunächst auf NADP übertragen. Die mit diesem Vorgang gekoppelte ATP-Bildungsrate ist jedoch nicht ausreichend für die steady-state CO_2-Fixierung, so daß der $NADPH_2$-Spiegel steigt. Bei so dezimiertem Pool an reduzierbarem NADP werden die Elektronen auf den nächstmöglichen Akzeptor, den Sauerstoff übertragen.
Durch alternierende Reduktion von NADP und Sauerstoff wird durch Selbstregulation die ATP-Konzentration auf der für die CO_2-Fixierung bei hoher

Lichtintensität erforderlichen Höhe gehalten. Ein meßbarer zyklischer Elektronentransport vermag demnach nur dann stattzufinden, wenn die Sauerstoff reduzierende Reaktion gesättigt ist, z.B. unter Stickstoff. Diese Hypothese ist durch die Annahme erweitert worden, daß der Sauerstoff generell den zyklischen Elektronentransport vergiftet (HEBER,1973).

2.3. Hemmstoffe der Photophosphorylierung

Es sollen in einem kurzen Abriß diejenigen der in der Arbeit verwendeten Hemmstoffe diskutiert werden, deren Wirkungsweise bisher nur ungenügend geklärt ist.

2.3.1. Antimycin A

Antimycin A ist ein bekannter Hemmstoff der oxidativen Phosphorylierung. Der Angriffspunkt soll zwischen Cytochrom b und Cytochrom c liegen (BERDEN und SLATER, 1972).
Da die Kaliumhexacyanoferrat (III)- katalysierte zyklische Photophosphorylierung von Chloroplastenpartikeln mit Antimycin A hemmbar ist, wurde geschlossen, daß Cyt b_{563} am zyklischen Elektronentransport beteiligt ist (ARNON, 1969; HIND et al., 1977; TAGAWA et al., 1963).
Bei niedrigen Lichtintensitäten kann auch der nicht-zyklische Elektronentransport beeinflußt werden (DRECHSLER et al.,1969; HIND,1968).

Höhere Konzentrationen des Antibiotikums wirken jedoch, vorzugsweise bei niedrigem pH, entkoppelnd auf den photosynthetischen Elektronen-

transport (DRECHSLER et al., 1969; HIND, 1968).

Nach BÖHME et al. (1971) ist auch die PMS katalysierte zyklische Photophosphorylierung durch Antimycin A hemmbar.
SLOVACEK und HIND (1977) zeigen, daß unter anaeroben Versuchsbedingungen, wenn die photosynthetische Sauerstoffentwicklung durch den zyklischen Elektronentransport teilweise unterdrückt wird, Antimycin A-Zugabe den nicht-zyklischen Elektronentransport steigern kann. Dies geschieht durch Hemmung des zyklischen Elektronentransports.
An intakten Zellen können durch Inkubation mit Antimycin A physiologische Vorgänge unterbunden werden, die nachweislich mit ATP aus der zyklischen Photophosphorylierung versorgt werden (BARBER, 1968; NULTSCH und BAI, 1966; SIMONIS, 1964; TANNER et al., 1965). Demgegenüber wird für Chloroplasten höherer Pflanzen (FORTI und ROSA, 1971) sowie Chloroplastenpartikel von Anacystis nidulans (BOTHE, 1969) eine zyklische Photophosphorylierung beschrieben, die Ferredoxin-katalysiert ist, jedoch nicht mit Antimycin A beeinflußt werden kann. In beiden Fällen wird eine Umgehung von Cyt b_{563} durch die Elektronen postuliert.
Das Ausbleiben einer Wirkung des Antibiotikums auf den zyklischen Elektronentransport von ganzen Zellen der blau-grünen Alge Anabaena variabilis unter anaeroben Bedingungen, nach Ausschaltung von PS II mit DCMU wird damit erklärt, daß die Permeation der Substanz Schwierigkeiten bereitet (IMAFUKU, 1976).
KATOH (1972) beobachtete, daß bei einer Inkubation unter Licht, Antimycin A zerstört wird und damit keine Hemmwirkung mehr ausüben kann.

HUBER und EDWARDS (1975) weisen für den zyklischen Elektronentransport von C_4-Mesophyll-Chloroplasten nach, daß der Transportweg durch DCMU umgelenkt wird und so eine Hemmung durch Antimycin A nicht mehr möglich ist. Nach Versuchsergebnissen von NULTSCH und BAI (1966) an blau-grünen Algen, muß diese Hypothese jedoch in Frage gestellt werden.
Neben dem direkten Einfluß von Antimycin A auf Teile der Elektronentransportkette ist auch eine Wirkung auf den Calvinzyklus intakter Chloroplasten beobachtet worden.
Unter anaeroben Bedingungen steigert Antimycin A-Zugabe die CO_2-Fixierungsrate (SCHACTER und BASSHAM, 1972). Unter aeroben Bedingungen ist unter suboptimalen Bedingungen (z.B. hohe P_i-Konzentration) eine Steigerung der CO_2-Fixierung zu beobachten (WALKER, 1976). Bei niedrigen Lichtintensitäten hemmt Antimycin A demgegenüber die CO_2-Fixierung bis zu 70%, während bei sonst gleichen Versuchsbedingungen eine gesteigerte Lichtintensität eine Steigerung der CO_2-Fixierung auslöst (SCHÜRMANN et al., 1971).

SCHACTER et al. (1971) vermuten, daß Antimycin A den enzymatischen Apparat, der die CO_2-Fixierung kontrolliert, beeinflußt. Später wurden diese Ergebnisse durch die Beobachtung ergänzt, daß die Ribulose-1,5-diphosphocarboxylase- und Fructose-1,6-diphosphatase-Aktivität indirekt gesteigert werden können (SCHACTER und BASSHAM, 1972).
Die Steigerung der CO_2-Fixierungsrate wird damit erklärt, daß durch Hemmung der Cyt b_{563}-Oxidation, der Pool an reduziertem Ferredoxin ansteigt. Letzteres soll speziell die Fructose-1,6-diphosphatase in ihrer Aktivität steuern (DRECHSLER et al., 1969; KATOH, 1972).
TANNER et al. (1966) zweifeln einen Einfluß auf

die CO_2-Fixierungsrate bei solchen Konzentrationen von Antimycin A an, die die zyklische Photophosphorylierung bereits hemmen. Aus der obigen Aufzählung geht hervor, daß die Wirkungsweise von Antimycin A recht vielfältig ist. Sowohl eine Hemmung der zyklischen Photophosphorylierung als auch eine erhebliche Beeinflussung des Calvinzyklus wird diskutiert.

2.3.2. Natriumazid

Natriumazid (NaN_3) ist eine Substanz, welche sowohl die Atmung als auch die Photosynthese von pflanzlichen in vivo und in vitro Systemen zu hemmen vermag. Während dabei die Hemmung der Atmung einer Wirkung des NaN_3 auf die Cytochromoxidase zugeschrieben wird (FORTI und GEROLA, 1977), sind für die Photosyntheseleistung unterschiedliche Reaktionen auf NaN_3-Zugabe beschrieben worden, woraus eine vielfältige Interpretation der Wirkungsweise resultiert.
Frühe Untersuchungen (GALSTON, 1955) weisen bereits auf die Hemmung der Katalase-Aktivität bei gleichzeitiger Wirkung auf PS II hin. FORTI und GEROLA (1977) zeigen für intakte Chloroplasten, daß durch die Katalasehemmung Superoxid (H_2O_2) freigesetzt wird, welches dann die photosynthetische Wasserspaltung zu hemmen vermag.
BAMBERGER und AVRON (1975) konnten für intakte Spinatchloroplasten zeigen, daß die Carbo-anhydrase, ein Enzym des Chloroplastenstromas welches die CO_2-Aufnahme reguliert, durch NaN_3 gehemmt wird. Sie erklären damit die Wirkung auf die CO_2-Fixierungsrate.
Neuere Untersuchungen an Spinatchloroplasten und ganzen Zellen von Chlorella pyrenoidosa weisen NaN_3 als einen Inhibitor aus, der den Elektronen-

transport an der oxidierenden Seite von PS II nach der Wasserspaltung unterbrechen kann. Die Hemmung der Hill-Reaktion (KATOH, 1972) und das Ausbleichen von Carotinoiden und Chlorophyll (YAMASHITA et al., 1969) können als ein Beweis für diese Hypothese angesehen werden. Bei Chlorella pyrenoidosa konnte bei Zugabe von NaN_3 mit einer Konzentration von 10^{-3} M die Beibehaltung der Sauerstoffbildungsfrequenz bei gleichzeitigem Einschwingen der Sauerstoff-Ertragsrate pro Lichtblitz auf ein niedrigeres Niveau beobachtet werden (MAISON- PETERI und ETIENNE, 1977).
Die Hemmwirkung auf die Wasserspaltung ist durch den pH des Reaktionsmediums, die Inkubtion bei Licht und die Inkubationsdauer beeinflußbar. Nicht geklärt bleibt, ob NaN_3 direkt auf die Photosynthese einwirkt, oder ob es über die Modifikation physiologischer Vorgänge indirekt auf den Elektronentransport Einfluß nimmt.

Aufgrund der beschriebenen Faktoren weist NaN_3 als Photosynthesehemmstoff deutliche Unterschiede in seiner Wirkung auf im Vergleich zu den bekannten Photosynthese-Inhibitoren (DCMU, DBMIB, KCN), welche auf der reduzierenden Seite von PS II bzw. der oxidierenden Seite von PS I den Elektronentransport blockieren. Der physiologische Effekt von NaN_3 ist jedoch der gleiche, d.h. es hemmt bei intakten Algen den Elektronentransport von der Wasserspaltung zum NADP.

2.3.3. Stickstoff

Für intakte Algen werden unter aeroben Bedingungen ohne Zusatz von Cofaktoren in der Regel negative Licht-minus-Dunkel-Werte (Δ ATP-Werte) gemessen. Der ATP-Pool dunkel adaptierter Algen

fällt bei Belichtung innerhalb weniger Sekunden auf ein Niveau unterhalb des Dunkel-Pools ab und oszilliert dann um einen konstanten Wert (BEDELL und GOVINDJEE, 1973; JONES, 1970; SCHÄFER, 1975; URBACH und GIMMLER, 1970). Es werden jedoch auch Versuchsanordnungen beschrieben, bei denen unter aeroben Bedingungen positive $\triangle$ ATP-Werte meßbar sind (BORNEFELD et al., 1972; GIMMLER, 1973; IMAFUKU, 1976; LEWENSTEIN und BACHOFEN, 1972; OKKEH et al., 1975). Die Diskrepanz der Ergebnisse ist möglicherweise auf unterschiedliche Vorbehandlung der Algen (Phosphatverarmung, Lagerung bei niedrigen Temperaturen, alternde Kulturen) oder deren Artspezifität zurückzuführen, welche die ATP-Regulation im Dunkeln beeinflußt.

Erst bei niedrigem Dunkel-ATP-Pool wird es möglich, positive $\triangle$ ATP-Werte zu messen und damit von den Poolmessungen an ganzen Zellen auf die ATP-Bildungsrate, d.h. die ATPase-Aktivität , rückzuschließen. Die Erniedrigung des Dunkel-ATP-Pools wird in der Regel durch Unterdrückung der oxidativen Phosphorylierung erreicht, indem man die Algensuspension mit Stickstoff (N_2) oder einem Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch (N_2/CO_2) begast. Bereits nach 3 -10 min (IMAFUKU, 1976; LÖPPERT und BRODA, 1973) stellt sich bei Anabaena variabilis bzw. Chlorella fusca im Dunkeln ein konstant niedriges Niveau ein. Diese Versuchsbedingungen werden im allgemeinen als anaerob bezeichnet, auch wenn bei sich anschliessender Belichtung Sauerstoff aus der Wasserspaltung freigesetzt wird, der die Anaerobiose schrittweise aufhebt.

Bei Begasung mit N_2 bzw. N_2/CO_2 ist jedoch auch eine Beeinträchtigung der Rate des nicht-zyklischen Elektronentransports festgestellt worden. Die Sauerstoff-Lichtintensitätskurve von N_2/CO_2-

begasten Kulturen ist im Vergleich zu nicht begasten Kulturen früher und auf einem niedrigeren Niveau gesättigt und fällt bei Steigerung der Lichtintensität wieder leicht ab. Antimycin A-Zugabe kann dabei die Sauerstoffentwicklung so weit steigern, daß die Lichtintensitätskurve deckungsgleich mit der unter Luft und Antimycin A-Zugabe gemessenen verläuft (HIND et al., 1977; SLOVACEC und HIND, 1977).
Hohe Lichtintensitäten unterdrücken unter N_2/CO_2-Atmosphäre demnach die photosynthetische Sauerstoffentwicklung. Die Ursache dafür wird in einem gesteigerten zyklischen Elektronentransport gesehen, der, ebenfalls über Plastochinon laufend, den nicht-zyklischen Transport behindert (SLOVACEK und HIND, 1977). Grundlegende Untersuchungen über die mögliche Wirkung von Sauerstoff auf die Änderung des Redox-Zustandes des Elektronenkarrier-Pools zwischen den Photosystemen sind von DINER und MAUZERALL(1973 a,b) und DINER (1974) veröffentlicht worden. Ausgangspunkt hierfür war die Beobachtung von FRANCK et al. (1945), daß die Lichtintensitätskurve der Sauerstoffentwicklung im nicht-sättigenden Bereich nicht linear verläuft, wenn mit Stickstoff begast wird. Die Autoren führen die Nicht-Linearität unter anaeroben Bedingungen darauf zurück, daß reduziertes NaDPH + H^+ und Sauerstoff den Redoxzustand von Plastochinon beeinflussen. Sauerstoff vermag demnach positiv auf die Sauerstoffentwicklung zurückzuwirken. Demnach unterliegt der Elektronenfluß bei Änderung des umgebenden Milieus einer veränderten Steuerung.

BURR (1966) konnte zeigen, daß die Lichtintensitätskurve des Sauerstoffs der p-Benzochinon-Hillreaktion unter anaeroben Bedingungen im lichtlimitierenden Bereich linear verläuft. Der Elektronentransport vom PS II bis zum Hill-Reagenz wird demnach nicht durch Sauerstoff reguliert.

SCHREIBER und VIDAVER (1974) haben diese auf Blitzlichtversuchen basierenden Ergebnisse durch Fluorezenzinduktionsmessungen ergänzt. Anaerobe Versuchsbedingungen sollen demnach die oxidierende Seite von PS II inaktivieren und damit optimale Bedingungen für einen zyklischen Elektronentransport schaffen.

3. ZIELSETZUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Aus Untersuchungen an Chloroplasten ist bekannt, daß wahrscheinlich zwei Energiekonservierungsstellen in der photosynthetischen Elektronentransportkette existieren, nämlich Wasserspaltung und Plastochinon. Es bestehen jedoch Schwierigkeiten, die durch einen zyklischen Elektronentransport verursachte Energiekonservierung am Plastochinon ohne Zusatz artifizieller Redoxsysteme an Chloroplasten nachzuweisen.
Untersuchungen an ganzen Zellen und Chloroplasten lassen des weiteren die Frage offen, ob diese zyklische Photophosphorylierung in vivo auch unter aeroben Versuchsbedingungen ablaufen kann.
Ziel dieser Arbeit ist es, die Energiekonservierungsstellen der Elektronentransportkette (Wasserspaltung, Plastochinon) in vivo an ganzen Zellen unter aeroben und anaeroben Versuchsbedingungen nachzuweisen und getrennt voneinander zu untersuchen.
Des weiteren soll die Beziehung zwischen Elektronentransportrate und ATP-Bildungsrate in vivo untersucht werden. Es sollen daher sowohl Messungen des Sauerstoff- und Kohlendioxid-Gaswechsels, als auch ATP-Messungen vorgenommen werden, um genauere Aussagen über die Kopplung der beiden Vorgänge machen zu können.
Die Messung der ATP-Bildungsrate von Chlamydomonas reinhardii erfolgt durch ATP-Poolbestimmungen während eines Dunkel-Licht-Wechsels. Es wird nachzuweisen sein,daß die Größe der Licht-minus-Dunkel-Pooldiffernz ($\triangle$ ATP-Wert) korrelierbar ist mit der jeweiligen ATP-Bildungsrate der intakten Zellen.

Die Untersuchungen werden an Synchronkulturen von Chlamydomonas reinhardii, einer einzelligen Grünalge vorgenommen. Die Schwankungen der Elektronentransport-Kapazität während des Entwicklungszyklus dieser Alge bieten die Möglichkeit, die ATP-Bildungsrate der beiden Energiekonservierungsstellen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen zu untersuchen, ohne daß von außen in das physiologische Gleichgewicht eingegriffen wird.
Untersuchungen der Gesamt-Photosynthesekapazität und der PS II- bzw. PS I- Kapazität dieser Alge zeigen gleichsinnige Aktivitätsschwankungen über den Entwicklungszyklus (FRICKEL-FAULSTICH, 1974). Es soll geklärt werden, ob die von den einzelnen Photosystemen getriebene Phosphorylierung diesen Änderungen parallel läuft.
Untersuchungen der Photophosphorylierung während des Entwicklungszyklus liegen für Ankistrodesmus braunii (URBACH und GIMMLER,1970 a,b) und Scenedesmus obliquus (SCHÄFER 1975) vor. Die Messungen wurden allerdings unter Anaerobiose vorgenommen, da erst unter diesen Versuchsbedingungen ein Anstieg des ATP-Pools bei Belichtung meßbar war.
Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, unter welchen Voraussetzungen eine zyklische Photophosphorylierung auch unter aeroben Versuchsbedingungen meßbar ist. Es soll die Frage zur Diskussion gestellt werden, ob unter physiologischen Bedingungen (d.h. in ganzen Zellen) erst bei Sauerstoffmangel eine Reduktion des primären Elektronenakzeptors der zyklischen Elektronentransportkette von Chlamydomonas reinhardii möglich ist (s. hierzu AVRON,1966; HEBER, 1973).

4. METHODIK

4.1. Objekt und Anzucht

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an der einzelligen Grünalge Chlamydomonas reinhardii Dangeard, Stamm 11-32 (Göttingen) durchgeführt. Die Anzucht erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem Nährmedium der folgendenZusammensetzung (KUHL, 1962):

KNO_3	1×10^{-2} M
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	$4{,}5 \times 10^{-3}$ M
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	$0{,}5 \times 10^{-3}$ M
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1×10^{-3} M
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1×10^{-4} M
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	$2{,}5 \times 10^{-5}$ M
$EDTA\text{-}Na_2$	$2{,}5 \times 10^{-5}$ M

Je 1 l der Chlamydomonas-Nährlösung enthielt 1 ml folgender Spurenelementlösung:

H_3BO_3	1×10^{-3} M
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1×10^{-3} M
$MnSO_4 \cdot H_2O$	1×10^{-3} M
$CUSO_4 \cdot 5\ H_2O$	1×10^{-5} M
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	1×10^{-5} M

Die Algensuspension befand sich in Kulturröhren von 42 cm Länge und 3,7 cm Durchmesser, die von unten mit einem Gasstrom durchperlt werden konnte (BISHOP und SENGER, 1971; SENGER et al., 1972). Die Kulturröhren standen in einem Lichtthermostat der Firma Kniese, Marburg (KUHL und LORENZEN, 1964). Die Synchronisation erfolgte in einem Licht-Dunkel-Wechsel von 14:$\overline{10}$ Stunden. Jeweils zu Beginn der Lichtzeit wurde die Algensuspension mit einer photometrisch kontollierten Verdünnung automatisch auf eine konstante

Zellzahl von 1,56 x 10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Temperatur des Lichtthermostaten wurde konstant auf 28° C gehalten. Die Kultur wurde ständig mit einem Gemisch von 3% CO_2 in Luft durchperlt. Durch die Kombination von je 4 Leuchtstoffröhren des Typs Osram-L 40W/19-1 (Tageslicht) und Osram-L 40W/25-1 (Universal weiß) betrug die Lichtintensität an der Oberfläche der Kulturröhren 20.000 Lux während der Lichtzeit.

4.2. Bestimmung der Bezugsgrößen

Die Ergebnisse der Messungen wurden alle auf Chlorophyll bezogen. Die Gesamt-Chlorophyllbestimmung erfolgte nach mehrmaliger Extraktion der Algenzellen mit siedendem Methanol unter Zusatz von Magnesiumhydroxidcarbonat. Die Messung der Extinktion des Methanolextraktes erfolgte bei 650 nm und 665 nm in einem Einstrahlphotometer PMQ III (Zeiss). Die Umrechnung wurde mit den von HOLDEN (1965) nach den spezifischen Extinktionskoeffizienten von MacKINNEY (1941) errechneten Formeln vorgenommen.

Gesamtchlorophyll (mg/l) = 25,5 x D_{650} + 4,0 x D_{665}
Chlorophyll a (mg/l) = 16,5 x D_{665} - 8,3 x D_{650}
Chlorophyll b (mg/l) = 33,8 x D_{650} - 12,5 x D_{665}

Das dichtest gepackte Zellvolumen (PCV) pro ml Algensuspension wurde in Hämatokritröhrchen (nach Hamburger) nach 5 minütiger Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Junior Christ III) bei höchster Tourenzahl bestimmt (1400 x g).
Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer (Thoma neu) ermittelt.

4.3. Herstellung von Chloroplastenpartikeln

Die Herstellung photosynthetisch aktiver Partikel von Chlamydomonas reinhardii erfolgte nach BERZBORN und BISHOP (1973), modifiziert nach MELL (1974) sowie SENGER und MELL (1977).
Die Algen wurden abzentrifugiert, einmal mit Aufbruchsmedium gewaschen, nochmals abzentrifugiert und anschließend in soviel Aufbruchsmedium suspendiert, daß eine Konzentration von 1 ml PCV/20 ml Aufbruchsmedium entstand.
Diese Suspension wurde für den Aufbruch der Zellen mit gewaschenen Glasperlen (0,7 mm Ø) gemischt und so in einen Stahlbecher gefüllt, daß die Mischung bis 2 mm unter den Rand des Stahlbechers stand und die Glasperlen mit dem Flüssigkeitsspiegel gleich hoch abschlossen.
Die Vibrogen-Zellmühle befand sich in einem Kältelabor (+4 ^{o}C). Der Stahlbecher mit dem Glasperlen/Algensuspensions-Gemisch wurde mit Eiswasser im Durchfluß 5 min vorgekühlt.Nach 5 minütigem Mahlvorgang wurde das Homogenat über eine Fritte (Schott + Gen. Typ 17D1) von den Glasperlen abgetrennt. Mit dem Volumen der eingesetzten Algensuspension wurden die Glasperlen in zwei Schritten gewaschen.
Das gefilterte Homogenat wurde durch Differentialzentrifugation (570 x g; 5 min) von den ganzen Zellen befreit und als Chloroplastenpartikelhomogenat in den Versuchen eingesetzt.
Die Zusammensetzung des Aufbruchsmediums, wie es BERZBORN und BISHOP (1973) wählten, wurde nach SELMANN und BANNISTER (1971) sowie GARNIER und MAROC (1971) modifiziert.

10^{-2} M	NaCl
10^{-2} M	KCl
2,5 x 10^{-3} M	$MgCl_2$
10^{-5} M	EDTA
2 x 10^{-2} M	Tricine /KOH-Puffer

Der Tricine-Puffer wurde durch einen Phosphat-Puffer nach Sörensen 0,05 M pH 7,5 ersetzt.

4.4. Polarographische Messung der Sauerstoffkonzentration

Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung, der Sauerstoffverbrauch bei der PS I Aktivität gemessen mit Ascorbat/DCPIP ⟶ Methylviologen sowie die Atmung wurden polarographisch mit einer Micro-Clark-Elektrode gemessen (FORK, 1972) in einem Gilson-Oxygraph (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin, USA). Die Polarisationsspannung betrug -0,8 V. Der Polarisationsstrom war der Sauerstoffkonzentration im Temperaturbereich von 20°C - 35°C proportional. Die Messung erfolgte bei 28°C in einer temperierbaren Reaktionskammer, in welche die Micro-Clark-Elektrode hineinragte. Eine Eichung zur quantitativen Sauerstoffmessung wurde vor jeder Messung gegen luftgesättigtes Wasser (bei 28°C, 245 µmol O_2/l; ESTABROOK, 1967) vorgenommen. Als Nullstrom diente der Zero-Current.
Die zeitabhängige Änderung der Sauerstoffkonzentration entsprach dem numerischen Wert des Tangens der aufgezeichneten Kurve. Die Verrechnung der Werte wurde auf Chlorophyll vorgenommen (ESTABROOK, 1967). Der Sauerstoffverbrauch im Dunkeln wurde als Atmung der bei Belichtung erfolgenden Sauerstoffentwicklung hinzugefügt.

Die Meßküvette wurde mit einem Projektor belichtet (Prado Universal Leitz, Lampe 24V, 250 W), in dessen Strahlengang sich ein cut-off-Filter aus rotem Plexiglas befand, so daß Wellenlängen >620 nm mit einer Lichtintensität von 2×10^5 erg/cm^2 · sec auf die Meßküvette auftrafen. Die Algensuspension in der Meßkammer wurde mit einem Magnetrührer durchmischt.
Zur Messung der Gesamt-Photosynthesekapazität wurden die Algen von der Nährlösung abzentrifugiert und in 0.05 M Sörensenpuffer pH 7.0 so resuspendiert, daß eine Zellkonzentration von 10 µl PCV/ml Puffer entstand.
Die Messung der PS I-Aktivität wurde mit Ascorbat (5×10^{-3} M) und DCPIP (10^{-4} M) als Elektronendonator und Methylviologen (2×10^{-4} M) als Elektronenakzeptor von PS I gemessen. Die Messung wurde an Chloroplastenpartikeln (Kap. 4.3.) vorgenommen, deren PS II-Restaktivität durch DCMU-Zugabe (1×10^{-5} M) unterbunden wurde. Der bei der Reduktion von Methylviologen durch PS I verbrauchte Sauerstoff wurde als Maß für die Kapazität des Photosystems gewertet. Einzelheiten des Reaktionsmechanismus sind in STOTMANN und v. GÖSSELN (1972) beschrieben.

4.5. Messung des CO_2-Gaswechsels

Die CO_2-Konzentration von Algensuspensionen wurde gemessen mit einer CO_2-Elektrode (Typ E 5036/0; Radiometer Kopenhagen, Dänemark) in Verbindung mit einem BG-1-Modul eines Oxygraphen (Gilson Medical Electroncis, Middleton, Wisconsin, USA). Die Elektrode ragte in dieselbe, auf 28°C temperierte Meßküvette, wie die zur Sauerstoffmessung verwendete Micro-Clark-Elektrode. Die Belichtung erfolgte wie in

Kap. 4.4 beschrieben.
Die Messung der CO_2-Konzentration erfolgt indirekt über die pH-Änderung der Algensuspension. Indem sich CO_2 im Medium löst, wird, proportional zum CO_2-Partialdruck, der pH desselben verändert (NICHOLLS et al., 1967). Eine Eichung der Elektrode auf absolute CO_2-Konzentrationen ist nicht erfolgt. Die Eichung auf Linearität für einen gewählten Meßbereich wurde durch eine Einrichtung des BG I-Moduls ermöglicht, die extern eine Spannung vorgibt, deren Wert dem 4-fachen der vorgegebenen CO_2-Grundkonzentration entspricht.
Zur Messung waren die Zellen mit einem PCV von 10 µl/ml in 0,05 M Sörensenpuffer pH 7,0 suspendiert. Die Algensuspension wurde gut geschüttelt, jedoch keinesfalls durchblasen, in die Meßküvette gefüllt und für eine Minute bei geöffnetem Meßgefäß auf 28°C temperiert, bevor die Messung bei geschlossner Meßküvette erfolgte.

4.6. Hemmstoffe

Die während der verschiedenen Versuchsansätze verwendeten Hemmstoffe werden größtenteils in Aqua bidest gelöst. Eine Ausnahme bilden :

DCMU: 50% abs. Äthanol; 50% Wasser
DBMIB: 100% abs. Äthanol
Antimycin A: 100% abs. Äthanol

Die äthanolischen Lösungen wurden in einem Konzentrationsverhältnis von maximal 1:100 der Algensuspension zugefügt. Die Zugabe der Hemmstoffe erfolgte stets im Dunkeln mit einer Endkonzentration von:

Antimycin A	:	$1x10^{-4}$ M
Ascorbat	:	$5x10^{-3}$ M
DCMU	:	$1x10^{-5}$ M
DCPIP	:	$1x10^{-4}$ M
DBMIB	:	$5x10^{-5}$ M/ $1x10^{-4}$ M
Methylviologen	:	$2x10^{-4}$ M/ $2x10^{-3}$ M
NaN_3	:	$5x10^{-3}$ M
p-Benzochinon	:	$4x10^{-4}$ M

Die Inkubationszeit betrug 5 min für p-Benzochinon, DCMU, DBMIB, Ascorbat und DCPIP und 10 min für die anderen verwendeten Hemmstoffe. Anaerobiose wurde durch gleichmäßiges Durchperlen der in einer Glasküvette befindlichen Algensuspension mit Stickstoff (N_2) bzw. mit einem Gemisch von 3% Kohlendioxid in Stickstoff (N_2/CO_2) erzielt. Die Gase waren bis auf 0,005% von Sauerstoff gereinigt, was dem Reinheitsgrad "spezial" der Firma Messer Griesheim entsprach. Stickstoff wurde zusätzlich durch einen Oxysorb HD Absorber (Messer Grieheim) geleitet, um die Sauerstoffverunreinigung zu erniedrigen.

4.7. ATP-Bestimmung an ganzen Algenzellen

4.7.1. Beschreibung von Meßmethode und Meßgerät

Die Bestimmungsmethode für ATP mit dem Luciferin-Luciferase-Test basiert auf Beobachtungen von MacELVOY und STREHLER (1949), die eine lineare Beziehung zwischen der Lumineszenz eines Luciferin-Luciferase-Testansatzes und einer zugegebenen ATP-Konzentration feststellten. Dieser

Test ist heute das empfindlichste und spezifischste Nachweisverfahren für ATP. Der Lumineszenz liegen die folgenden chemischen Reaktionen zugrunde.

(1) ATP+Luciferin $\xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{Luciferase}}$ Adenyl-Luciferin+ Pyrophosphat

(2) Adenyl-Luciferin $\xrightarrow[O_2]{}$ Adenyl-oxy-Luciferin + H_2O + Licht

Reaktion (1) ist reversibel, wobei das Gleichgewicht auf der rechten Seite liegt, Reaktion (2)ist praktisch irreversibel, d.h. das Reaktionsprodukt Adenyl-oxy-luciferin ist ein Inhibitor der Lumineszenz-Reaktion (STREHLER, 1970).
Zur ATP-Bestimmung mißt man die Intensität des Lichtes, das eine Luciferaselösung nach Vermischung mit einer ATP-Lösung in Gegenwart ausreichender Mengen an Mg^{2+}, Sauerstoff und Luciferin ausstrahlt. Zwei Meßprinzipien können zur Lichtmessung verwandt werden. Bei Verwendung eines Fluorimeters wird wenige Sekunden nach Vermischung des Enzyms mit ATP der erste schnelle Anstieg der Lichtintensität gemessen und verrechnet (STREHLER; 1970.). Die Empfindlichkeit verschiedener Gerätetypen, die nach diesem Meßprinzip arbeiten, wird bei weitem übertroffen durch den Liquid-Scintillation-Counter. Dieser mißt additiv nach einer bestimmten Zeit die von dem Reaktionsmedium in einer definierten Zeitspanne abgegebenen Lichtblitze und registriert diese als counts per minute (CPM). Liquid-Scintillation-Counter arbeiten bei Beschickung mit radioaktivem Material mit Coincidence-Verschaltung. Bei so eingestelltem Gerät ist jedoch keine Linearität von counts pro ATP vorhanden. Für den Luciferin-Luciferase-Test ist es erfor-

derlich, durch Verwendung nur eines Photomultipliers die Coincidence-Verrechnung auszuschalten, so daß im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-12} M ATP eine lineare Beziehung zwischen ATP-Konzentration und Lichtemission vorliegt (STANLEY und WILLIAMS, 1969). Durch technische Veränderungen kann das dann auftretende Grundrauschen des Gerätes unterdrückt werden (SCHRAMM,et al.1971)

Als Meßgerät stand ein Liquid-Scintillation-Counter LS 3133 T der Firma Beckman zur Verfügung. Zur Messung wurde ein Photomultiplier ausgeschaltet, so daß der Counter nunmehr als Photomultiplier mit sehr hoher Empfindlichkeit im Bereich des UV-Spektrums arbeitet. Der Wegfall der Coincidence-Verschaltung durch Verwendung nur eines Photomultipliers machte es erforderlich, die Hochspannung desselben zu erniedrigen, um das hohe Grundrauschen im unteren Spektralbereich zu eliminieren. Es wurde daher ein Schalter und ein zusätzliches Potentiometer in das Gerät eingebaut, um die Hochspannung manuell zu regulieren.
Während durch die fest montierten Potentiometer der output des Photomultipliers reguliert wird, d.h. die Einstellung eines "Fensters" vorgegeben wird und damit feststeht, bis zu welcher Impulshöhe (von 0 bis 1000) gemessen wird (z.B. ^{3}H 0-300, ^{14}C 0-600, ^{32}P 0-1000), ändert das zusätzlich eingebaute Potentiometer bei gegebener Fenstereinstellung das Verhältnis derselben zueinander nicht. Es verschiebt vielmehr in horizontaler Richtung das Spektrum linear, indem die Photomultiplier-Eingangsspannung reguliert wird und eliminiert damit das Grundrauschen des Gerätes, welches normalerweise durch die Coincidence-Verschal-

tung verrechnet werden würde.

4.7.2. Versuchsanordnung zur ATP-Extraktion

Es wurden 10 ml einer Algenprobe mit einer Suspensionsdichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung in eine auf 28°C temperierbare Glasküvette gefüllt und mit Gas durchperlt. Um höhere ATP-Konzentrationen zu erhalten, wurde für alle mit p-Benzochinon durchgeführten Versuche eine Zellsuspension von 5 µl PCV/ml Nährlösung eingesetzt. Die Glasküvette war von 2 Seiten abgeflacht bis auf eine Dicke von 1.8 cm. Der Durchmesser betrug ca. 8 cm. Die Küvette wurde von 2 Seiten mit je einem Projektor (Prado Universal, Leitz) beleuchtet, in dessen Strahlengang sich je ein cut-off Filter (RG 620 Schott Mainz) befanden. Jede Breitfläche der Küvette wurde mit Wellenlängen >620 nm und einer Intensität von $1 \times 10^5 erg/cm^2.sec$ belichtet.
Die Algensuspension wurde 10 Minuten lang in völliger Dunkelheit belassen und je nach Versuchsansatz mit Preßluft, Stickstoff (spezial) oder einem Stickstoff + CO_2-Gasgemisch (reinst) begast und mit Hemmstoffen versetzt (s. hierzu auch Kap. 4.6.). Am Ende der Dunkelzeit wurden 3 Proben von je 1 ml mit einer Eppendorfpipette aus der Küvette entnommen und sofort in 0,2 ml eisgekühlter 35%iger Perchlorsäure abgetötet. Während der sich anschließenden Belichtung wurden nach 5,10,15,25,40,50,70 Sekunden weitere Proben aus der Küvette entnommen und ebenfalls sofort in Perchlorsäure abgetötet. In einem Fall (Kap. 5.2.10.) wurden die Proben direkt aus der Kulturröhre entnommen und in Perchlorsäure abgetötet.
Die Proben extrahierten danach 30Minuten in

der Kälte im Dunkeln. Danach wurden sie mit einem Neutralisationsgemisch (ca. 0,28 ml) versetzt und während des 10-minütigen Stehenlassens gut durchgeschüttelt und mit pH-Papier kontrolliert. Es wurde ein pH von 7.4 eingestellt.
Von dem anschließend in einer Christ-Zentrifuge (Typ UJ3) für 10 Minuten bei 5000 UPM abzentrifugierten Extraktionsgemisch wurde jeweils 1 ml Überstand in ein Zentrifugenglas sauber abpipettiert und kaltgestellt.
Die Versuchsanordnung entspricht in wesentlichen Zügen der von SCHÄFER (1975) beschriebenen Methode.

Neutralisationslösung:	22,5 ml	ges.KOH
	17,5 ml	1 M KCl
	60 ml	1 M Trislösung

4.7.3. Herstellung eines Reaktionsgemisches zur ATP-Messung

Für die ATP-Messung wurde täglich mit frisch bidestilliertem Wasser ein 6 x 10^{-1} M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 mit 5.5 x 10^{-1} M $MgSO_4$ angesetzt. Der Puffer wurde über ein Membranfilter (Satorius Göttingen) mit einer Porengröße von 0,2 µl in ein Gefäß filtriert. Dieses war wie auch die Meßtöpfchen (Plastik-Scintillationstöpfchen, Fa. Beckman) nach gründlicher Säurespülung und anschließender Aqua dest. Wäsche bis zur Verwendung in einem Trockenschrank bei 100°C aufbewahrt worden, um bakterielle Kontamination zu vermeiden (STANLEY und WILLIAMS, 1969; CHEER, 1974).
9,3 ml der Pufferlösung und 0,95 ml Aqua bidest wurden in die abgekühlten Scintillationstöpfchen

pipettiert und im Kühlschrank auf Temperaturen $< 10^{o}C$ abgekühlt. Erst die abgekühlte Lösung durfte mit 0,5 ml 1 M $Na_2H\ AsO_4$-Lösung versetzt werden, da bei höheren Temperaturen Magnesiumarsenat ausfällt, welches die Lumineszenz löschen würde.

Die Zugabe von Arsenat soll das Abklingen der Lumineszenz verzögern, die bei der enzymatischen Reaktion von ATP mit dem Luciferin-Luciferase-Gemisch ausgestrahlt wird.

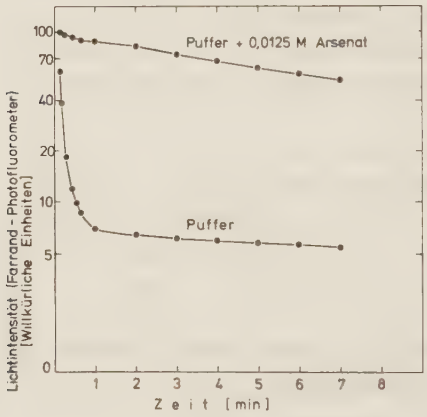

Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der Lumineszenz einer Luciferin-Luciferase-ATP-Lösung im Succinat-Puffer pH 7.4 mit und ohne Zugabe von Arsenat (aus STEHLER, 1970).

Zu dem Reaktionsgemisch wurden dann 0,2 ml eines Luciferin-Luciferase-Extraktes pipettiert.
Zur Herstellung der Enzymlösung waren dem gefriergetrockneten firefly-Präparat (FLE 50, Fa. Sigma) 5 ml Aqua bidest pro Gläschen zupipettiert worden. Die Lösung war nach 30 Minuten Extraktionszeit in der Kälte, bei 5000 UPM in einer Christ-Zentrifuge (Typ UJ3) abzentrifugiert und dekantiert worden.

Vor der Messung des ATP-Extraktes wurden die Scintillationsfläschen mindestens 3 Stunden in der Kälte aufbewahrt, um ein Abklingen des Enzym-Blindwertes zu ermöglichen (CHEER, 1974).

Ansatz für die Meßtöpfchen:

8,3 ml	des 6×10^{-1} M Tris-HCl Puffers pH 7,4 mit $5,5 \times 10^{-1}$ M $MgSO_4$
0,95 ml	Aqua bidest
0,5 ml	Arsenat
0,2 ml	Luciferin-Luciferase

Die ATP-Messung erfolgte in einem Raum bei grünem Schutzlicht, da die Scintillationstöpfchen Weißlicht absorbieren, welches sie dann während des Meßvorgangs emittieren. Die Meßtöpfchen wurden mit 50 µl des ATP-Extraktes versetzt, gut verschlossen, kräftig geschüttelt und anschließend in das Gerät eingefahren. Nach einer definierten Zeitspanne (10 sec) wurden die Proben viermal für 7 sec gemessen.
Die ATP-Messung wurde in einem Raum vorgenommen, der auf 17°C temperiert war, um im Temperaturoptimum des Enzyms zu messen. Die Messungen wurden am Tag der Extraktion vorgenommen, da das ATP nach 16 Stunden merklich zerfällt (STREHLER, 1970).

4.7.4. Verrechnung der Meßwerte

Zur Verrechnung der ATP-Messung wurde ca. alle 30 Minuten während des Meßvorgangs eine Eichkurve mit bekannter ATP-Konzentration (10^{-10} – 10^{-11} M ATP-Lösung) erstellt. Dies war erforderlich, weil die Aktivität des Enzyms ständig abfiel . Die Messung mit definierten ATP-Mengen erfolgte wie beschrieben mit den Scintillationstöpfchen.

Ansatz für die Eichtöpfchen:

8,3 ml des 6 x 10^{-1} M Tris-HCl-Puffers mit 5,5 x 10^{-1} M $MgSO_4$

0,5 ml Arsenat

0,2 ml Luciferin-Luciferase

Statt 0,95 ml Aqua bidest und 0,05 ml ATP-Extrakt, wurde eine definierte ATP-Lösung von 1 ml vor der Messung den Eichtöpfchen zugesetzt. Aus der in Abb. 3 wiedergegebenen Eichkurve ist zu entnehmen, daß beim Liquid Scintillation Counter LS 31 33 T günstigerweise im Bereich von 50.000 bis 500.000 counts per minute (CPM) gemessen werden sollte. Dies konnte dadurch erreicht werden, daß größere oder kleinere Mengen als 0,05 ml des ATP-Extraktes den Meßtöpfchen zupipettiert wurden.

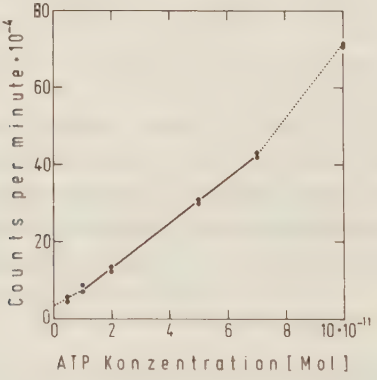

Abb. 3: Abhängigkeit der Lichtblitz-Zählrate (counts per minute) von der zugesetzten Konzentration an ATP. Der Luciferin-Luciferase-Test erfolgte in Scintillationsgefäßen mit dem in Kap. 4.6.4. beschriebenen Eichansatz in einem Liquid-Scintillation-Counter nach Ausschaltung der Coincidence-Schaltung.

Zur Aufstellung der Eichkurve und zur Berechnung der absoluten ATP-Konzentration wurde jeweils der 4. Meßwert (CPM) verwendet, der vom Liquid-Scintillation-Counter ausgedrückt wurde.

Zur Berechnung der $\triangle$ ATP-Werte, d.h. der Licht-minus-Dunkel-ATP-Poolhöhen wurde der Dunkelwert aus dem Mittel der drei vor Belichtung entnommenen Proben errechnet und vom Lichtwert substrahiert, der sich aus dem Mittel der 5,10,15 sec nach Belichtungsbeginn entnommenen Proben errechnet (s.a. Kap. 5.2.1.).

4.8. ADP-Bestimmung an ganzen Zellen

Die ADP-Bestimmung erfolgte mit Proben, die nach der in Kap. 4.6.2. beschriebenen Versuchsanordnung aufgearbeitet worden sind. Zur Messung wurde das ADP der Proben und der Eichansätze zu ATP aufphosphoryliert mit Creatinphosphat in Gegenwart von Creatinkinase:

$$\text{ADP} + \text{Creatinphosphat} \xrightarrow[\text{kinase}]{\text{Creatin-}} \text{ATP} + \text{Creatin}$$

Dazu wurden die folgenden Lösungen in ein Zentrifugenglas pipettiert:

0,3 ml Glycin/NaOH-Puffer, 0,1 M, pH 9,0
0,1 ml 1 mM $MgSO_4$
0,05 ml Creatin-phosphat (6 mg Extrakt/ml Glycinpuffer pH 9,0)
0,05 ml Creatin-Kinase (0,4 mg Extrakt/ml Glycinpuffer pH 9,0)
0,5 ml des ADP/ATP-Extraktes bzw. der ADP-Eichlösung verschiedener Konzentration.

Die Lösungen wurden gut durchmischt und für 15 Minuten bei 38°C inkubiert. Dabei erfolgte eine

quantitative Umsetzung von ADP zu ATP. Anschliessend wurde die Creatinkinase inaktiviert durch Erhitzen der Lösung auf 95°C für 3 Minuten (KRAUSE, 1973; GRUBER et al., 1970). Die Messung des in ATP überführten ADP erfolgte mit dem Luciferin-Luciferase-Test nach dem in Kap. 4.6.3. beschriebenen Verfahren. Parallel dazu erfolgte jeweils die Bestimmung der ATP-Konzentration der restlichen Probe, die nicht mit Creatinphosphat/Creatinkinase behandelt wurde. Die Differenz zwischen beiden auf die absoluten ATP-Gehalte verrechneten Werte entsprach der Menge an ADP in diesen Proben.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1. Charakterisierung von Photosynthese und Atmung während des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii

5.1.1. Messung der Photosynthese-Kapazität und der PS II- und PS I-Aktivität

Da der photosynthetische Elektronentransport und die Photophosphorylierung miteinander gekoppelt sind, kann man aus den Messungen der Photosynthesekapazität Rückschlüsse auf mögliche ATP-Bildungsraten bei Belichtung ziehen. Es ist demnach auch zu erwarten, daß die ATP-Synthese denselben regulatorischen Prozessen unterliegt, wie der photosynthetische Elektronentransport. Aus diesen Gründen soll den Darstellungen der ATP-Pool-Meßergebnisse eine Beschreibung der Photosynthesekapazität von Chlamydomonas reinhardii vorangestellt werden. Photosynthese- und Photophosphorylierungskapazität werden in allen folgenden Versuchen jeweils auf den Chlorophyllgehalt der Zellen bezogen.
Die in der Arbeit beschriebenen Versuche wurden an Synchronkulturen der Grünalge Chlamydomonas reinhardii durchgeführt. Synchrone Kulturen von Mikroalgen werden seit langem zur Untersuchung entwicklungsphysiologscher Vorgänge eingesetzt (LORENZEN, 1970; LORENZEN und HESSE, 1974; PIRSON und LORENZEN, 1966; SENGER;1975; TAMIYA 1966). Chlamydomonas reinhardii wird üblicherweise in einem Licht-Dunkel-Wechsel von 14:$\overline{10}$ Stunden synchronisiert, wobei die Zellen innerhalb von 24 Stunden simultan die verschiedenen Entwicklungsstadien durchlaufen, von der geteilten Spore bis zur sich teilenden Sporenmutterzelle. Generell ist für Synchronkulturen von Grünalgen ein

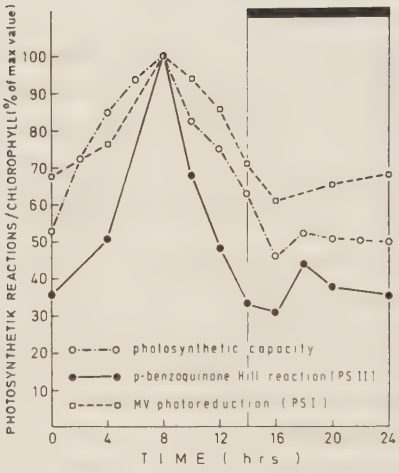

Abb. 4: Sauerstoffentwicklung der Photosynthese und der Hill-Reaktion sowie PS I abhängiger Sauerstoffverbrauch durch die Photoreduktion von Methylviologen während des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii.
Die Zellen wurden im Wechsel von 14 Std. Licht (20 000 Lux) zu 10 Std. Dunkel bei 30°C unter Begasung mit 3% CO_2 in Luft synchronisiert. Zur Messung wurde eine Algensuspension verwendet von 10 µl PCV/ml 0,05 M Sörensenpuffer pH 7,0. Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei Ascorbat : 5×10^{-3} M bei DCPIP 1×10^{-4} M bei Methylviologen 2×10^{-3} M und bei p-BQ 4×10^{-4} M. Die Änderungen der Sauerstoffkonzentration wurden polarographisch mit einer Micro-Clark-Elektrode bei sättigendem Licht von Wellenlängen $\geq$ 620 nm gemessen. Die Abb. wurde entnommen aus SENGER (1978).

Anstieg der Photosynthesekapazität bis zur Mitte der Lichtzeit gemessen worden, dem ein Abfall bis zu einem Minimum kurz vor der Autosporenfreisetzung folgt (LORENZEN, 1970; SENGER, 1970). Für Chlamydomonas reinhardii liegt das Maximum um die 8. Stunde und das Minimum um die 16. Stunde des Entwicklungszyklus (Abb. 4) (s. a. FRICKEL-FAULSTICH, 1974; SCHOR, et al 1972). Die p-Benzochinon-Hill-Reaktion, die ein Maß für die PS II-Aktivität ist, verläuft parallel zu den Schwankungen der Photosynthesekapazität über den Entwicklungszyklus (Abb. 4). Sowohl die PS II-Aktivität als auch die Photosynthesekapazität sind im Bereich von 8 - 10 x 10^4 erg/cm^2 · sec lichtgesättigt (Abb. 4; s.a. SENGER, 1978).

Die PS I-Aktivität kann zum einen an ganzen Zellen als Photoreduktion des Kohlendioxid durch Wasserstoff gemessen werden. Diese Reaktion läuft nur unter anaeroben Versuchsbedingungen im lichtlimitierenden Bereich ab (SENGER, 1974). Die PS I-Aktivität kann jedoch zum anderen auch noch an Chloroplastenpartikeln unter aeroben Versuchsbedingungen bestimmt werden, und zwar als Elektronenfluß vom Ascorbat/DCPIP über PS I zum Methylviologen (STROTMANN und v.GÖSSELN, 1972). Aus Abb. 4 ist zu ersehen, daß die Aktivitätsschwankungen von PS I mit Ascorbat/DCPIP ——→ MV ebenfalls parallel laufen zu den Schwankungen der Photosynthesekapazität über den Zyklus. Die 16. Std. zeigt eine um 46% niedrigere Aktivität als die 8. Std. Die Kapazität von PS I gemessen als Photoreduktion von Kohlendioxid weist demgegenüber nur eine Erniedrigung der Aktivität zur 16. Std. um 26% auf (SENGER, 1974).

Für die 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus wurde an Chloroplastenpartikeln von Chlamydomonas reinhardii eine Lichtsättigungs-

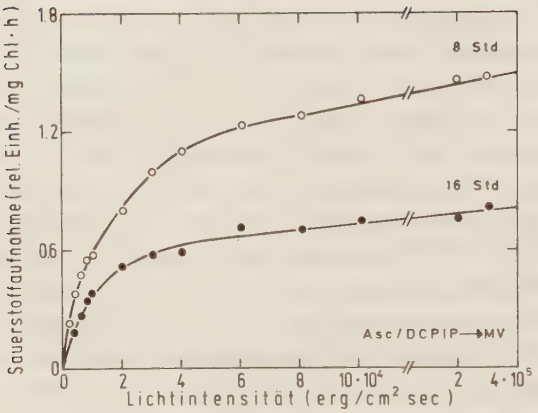

Abb. 5: Abhängigkeit der PS I Aktivität von der Lichtintensität gemessen an Chloroplastenpartikeln der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii mit Asc./DCPIP ⟶ Methylviologen. Die Konzentration der verschiedenen Zusätze betrug : Ascorbat 5 x 10^{-3} M, DCPIP 1 x 10^{-4} M Methylviologen 2 x 10^{-4} M. Die Sauerstoffaufnahme wurde polarographisch mit einer Micro-Clark-Elektrode gemessen an Zellen einer Suspensionsdichte von 10 µl PCV/ml 0,05 M Sörensenpuffer pH 7,0. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen $>$620 nm. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4

kurve der PS I-Aktivität mit Ascorbat/DCPIP ⟶ MV gemessen (Abb. 5). Die Lichtsättigung von PS I tritt etwas früher ein als die von PS II. Typisch für die Lichtsättigungskurven mit artifiziellen Elektronendonatoren und Elektronenakzeptoren ist das Phänomen, daß kein konstanter Wert im Bereich bis 6 x 10^6 erg/cm^2. sec erreicht wird (NEUMANN et al., 1971).
Auch aus Abb. 5 ist zu ersehen, daß bei der hier gemessenen PS I Reaktion bei hohen Lichtintensitäten kein konstanter Sättigungswert erreicht wird. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, daß die limitierenden Schritte der CO_2-Fixierung nicht vorhanden sind und der von den artifiziellen Elektronendonatoren induzierte Elektronentransport nur über einige der nativen Elektronentransportketten-Komponenten reguliert wird.

Die referierten und ergänzend dazu durchgeführten Versuche zur Photosynthesekapazität von Chlamydomonas reinhardii machen deutlich, daß zur 8. und zur 16. Std. des Entwicklungszyklus ein Maximum bzw. ein Minimum einer Sauerstoffproduktion meßbar ist. Schwankungen mit ähnlichem Ausmaß zeigt auch die jeweilige Messung der Aktivität von PS II und PS I.
Die Lichtsättigung sowohl der photosynthetischen Sauerstoffproduktion, als auch der Aktivitäten der beiden Photosysteme liegen annähernd im selben Bereich 6 -10 x 10^4 erg/cm^2. sec.
Es stellt sich nun die Frage nach den Ursachen der Aktivitätsschwankungen.
SCHOR et al. (1970) schreiben der Änderung der Cytochromkonzentration während des Entwicklungszyklus die Fähigkeit zu, den Elektronentransport von Chlamydomonas reinhardii zu regulieren. Auch für Bumilleriopsis filiformis (HESSE et al.,

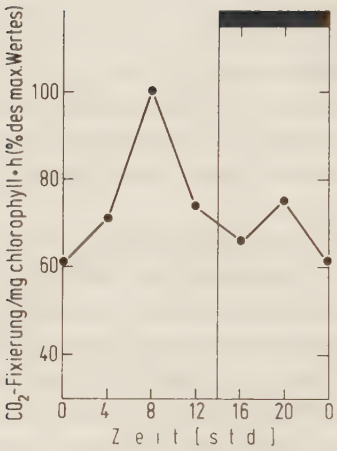

Abb. 6: Änderung der CO_2-Fixierungskapazität während des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii.

Die Zellen wurden im Wechsel von 14 Std. Licht (20 000 Lux) zu 10 Std. Dunkel in 30°C unter Begasung mit 3% CO_2 in Luft synchronisiert.
Die Änderung der CO_2-Konzentration wurde polarographisch mit einer CO_2-Elektrode (Typ E 5036/0 Radiometer, Kopenhagen) bei Licht von Wellenlängen > 620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2. sec gemessen. Die Zelldichte betrug 10 µl PCV/ml 0,05 M Sörensenpuffer pH 7,0.

1977) wurde eine Regulation der Elektronentransport-Rate durch die Cytochrome postuliert. Demgegenüber steht die Hypothese von SENGER und FRICKEL-FAULSTICH (1974), daß die Reoxidation von PQ der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des photosynthetischen Elektronentransportes im Lichtsättigungsbereich ist.

5.1.2 Messung der CO_2-Fixierung und der CO_2-Freisetzung

CO_2-Fixierung und CO_2-Freisetzung sind ein Maß für Stoffwechselvorgänge, die den ATP-Spiegel der Zellen wesentlich beeinflussen in dem Sinne, daß zum einen ATP verbraucht (Calvinzyklus) und zum anderen ATP gebildet (Atmung) wird. Es ist daher sinnvoll, die Kapazität des CO_2-Gaswechsels von Chlamydomonas reinhardii während des Entwicklungszyklus zu untersuchen.
Wie in Abb. 6 dargestellt ist, zeigt die CO_2-Fixierungskapazität, gemessen im Lichtsättigungsbereich, ähnliche Aktivitätsschwankungen über den Entwicklungszyklus wie die Photosynthesekapazität. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da man davon ausgeht, daß eine enge Verknüpfung zwischen photosynthetischer Sauerstoffproduktion, Reduktion von NADP und CO_2-Fixierungsrate besteht.
Abb. 7 gibt für die 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii eine Lichtintensitätskurve für die CO_2-Fixierungskapazität wieder. Zum Vergleich wurde simultan an derselben Probe , jedoch mit einer Sauerstoff-Elektrode, auch eine Lichtintensitätskurve der photosynthetischen Sauerstoffproduktion aufgestellt (Abb. 8). Aus den Kurven geht hervor, daß sowohl die Sauerstoffproduktion, als

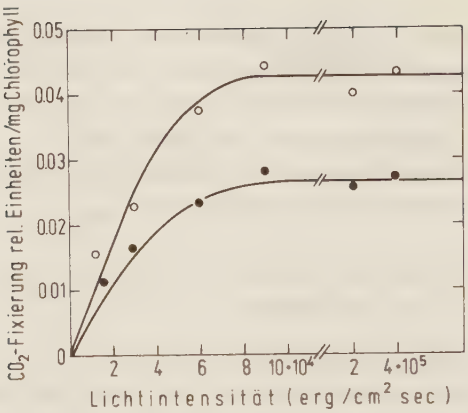

Abb. 7: Abhängigkeit der CO_2-Fixierungskapazität von der Lichtintensität gemessen in Zellen der 8. Std. (O——O) und 16. Std. (●——●) des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii. Die CO_2-Konzentration wurde polarographisch mit einer CO_2-Elektrode (Typ E 5036/0 Radiometer, Kopenhagen) gemessen in Zellsuspensionen von 10 µl PCV/ml 0,05 M Sörensenpuffer pH 7,0. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen 620 nm. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4

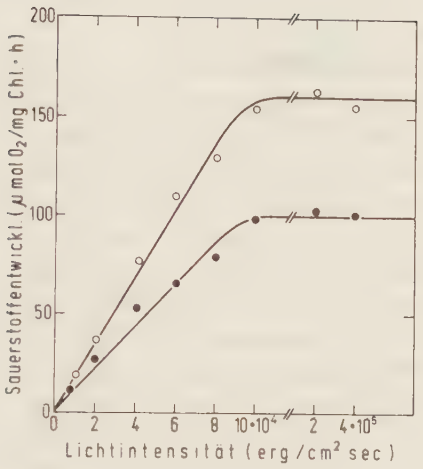

Abb. 8: Abhängigkeit der Photosynthesekapazität von der Lichtintensität gemessen an Zellen der 8. Std. (o —— o) und 16. Std. (● —— ●) des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii. Die Sauerstoffproduktion wurde polarographisch mit einer Micro-Clark-Elektrode gemessen in Zellsuspensionen von 10 µl PCV/ml 0,05 M Sörensenpuffer pH 7,0. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen $>$ 620 nm. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

auch die CO_2-Fixierung bei denselben Lichtintensitäten gesättigt ist
Bereitstellung und Verbrauch von ATP durch die Licht- und die Dunkelreaktion der Photosynthese laufen gleichzeitig ab, wobei der Gesamt-ATP-Spiegel einer wirkungsvollen Regulation unterliegt. Dadurch wird ein möglicher Vergleich der ATP-Pool-Änderungen mit den ATP-Bildungsraten bei Belichtung erschwert.
Die im Dunkeln gemessene CO_2-Freisetzung durch die Algen ist demgegenüber ein Maß für die oxidative Phosphorylierung, die in den Mitochondrien stattfindet. In Abb. 9 ist die Atmungskapazität, gemessen als CO_2-Entwicklung im Dunkeln, über den Entwicklungszyklus dargestellt.

Während der Lichtzeit, von der O. Std. bis zur 14. Std. des Entwicklungszyklus, sinkt die Atmungskapazität ständig ab. Ob von der Zelle weniger ATP benötigt wird, oder ob eine zusätzliche Energieversorgung durch die Photophosphorylierung erfolgt, kann nicht geklärt werden. Beim Übergang in die Dunkelphase steigt die CO_2-Fixierung sprunghaft an. Der Abfall der Atmungskapazität im Dunkeln kann als Ausdruck eines geringer werdenden Bedarfs an ATP durch die jungen Autosporen angesehen werden. Wesentliche Syntheseschritte der Algen sind kurz vor der Teilung abgeschlossen worden. Wie später diskutiert wird, ist es während der Dunkelphase sogar möglich, trotz sinkender Atmungskapazität den Gesamt-ATP-Spiegel der Zellen stetig zu erhöhen. Vergleiche der absoluten Werte der oxidativen Phosphorylierung weisen den Grünalgen im Gegensatz zu den blau-grünen Algen eine sehr hohe Atmungskapazität zu (BORNEFELD und SIMONIS, 1974).

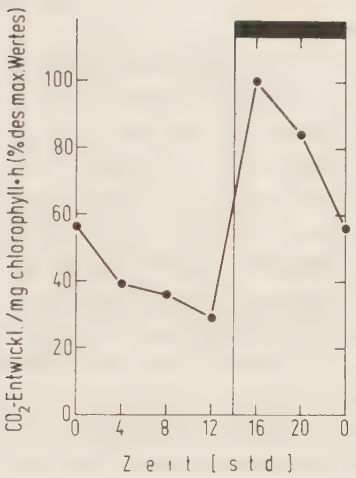

Abb. 9: Änderung der CO_2-Entwicklungskapazität (Atmung) im Dunkeln während des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii. Die Änderung der CO_2-Konzentration wurde polarographisch mit einer CO_2-Elektrode (Typ E 5036/0 Radiometer, Kopenhagen) gemessen. Die Zelldichte betrug 10 µl PCV/ml 0,05 M Sörensenpuffer pH 7,0.
Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

5.1.3. Wirkung von NaN_3 und Methylviologen auf die Atmung und die Photosynthese

Aus Versuchen an Scenedesmus obliquus (SCHÄFER, 1975) kann geschlossen werden, daß eine zyklische Photophosphorylierung nur meßbar ist, wenn zum einen die Wasserspaltung gehemmt ist und wenn zum anderen der Dunkel-ATP-Pool erniedrigt wurde. Nach Hemmung des Elektronentransports mit DCMU und Drosselung der Atmungsaktivität durch Stickstoffbegasung, ist an Scenedesmus obliquus eine zyklische Photophosophorylierung gemessen worden (SCHÄFER, 1975). Ein Ziel dieser Arbeit ist es jedoch, nachzuweisen, daß eine zyklische Photophosphorylierung auch unter aeroben Versuchsbedingungen stattfinden kann. Es war daher unerläßlich, geeignete Hemmstoffe zu finden, welche die beiden oben angeführten Grundvoraussetzungen für eine positive $\triangle$ ATP-Messung schaffen.
Bei der Kontrolle der Wirkung von NaN_3 auf die Atmung stellte sich nun heraus, daß der Hemmstoff auch die photosynthetische Sauerstoffentwicklung beeinflußt. Es wurde daher die Abhängigkeit der Sauerstoffproduktion von der NaN_3-Konzentration in der Zelle untersucht. Aus Abb. 10 geht hervor, daß NaN_3 die Sauerstoffentwicklung sowohl der 8. Stunde als auch der 16. Stunde des Entwicklungszyklus gleich gut zu hemmen vermag. Vorversuche mit der ATP-Pool-Messung zeigten des weiteren, daß NaN_3 auch den Dunkel-ATP-Pool erniedrigt (Abb. 15/16).Bei Verwendung dieses Hemmstoffs werden somit beide Voraussetzungen geschaffen, um eine zyklische Photophosphorylierung meßbar zu machen.
NaN_3 wird im folgenden eingesetzt mit der für die Hemmung der photosynthetischen Sauerstoffbildung ausreichenden Endkonzentration von 5×10^{-3} M. Die verbleibende Restaktivität der At-

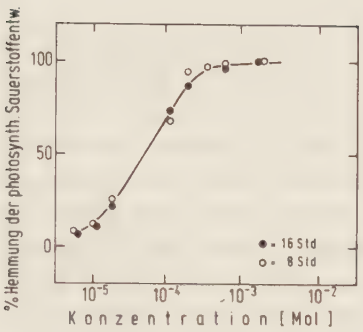

Abb. 10: Prozentuale Hemmung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit von der NaN_3-Konzentration in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii.
20 µl PCV Zellen waren in 2ml 0,05 M Sörensenpuffer pH 7,0 suspendiert. Nach 10 min Dunkel-Inkubation mit NaN_3 wurde die Sauerstoffentwicklung polarographisch mit einer Micro-Clark-Elektrode gemessen. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen >620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2 . sec.

mung hat keinen störenden Einfluß auf die △ ATP-Wert-Bestimmung .

Es ergab sich weiterhin die Notwendigkeit, Methylviologen, einen Elektronenakzeptor von PS I für ganze Zellen von Chlamydomonas reinhardii einzuführen. Methylviologen hält die Wasserspaltung und den sich anschließenden Elektronentransport über beide Photosysteme in Gang. Es verhindert aber sowohl einen zyklischen Elektronentransport als auch die NADP-Reduktion (IZAWA et al., 1966; STROTMANN und v. GÖSSELN, 1972). Die Unterbindung der CO_2-Fixierung an ganzen Zellen hat zur Folge, daß das ATP, welches während der Photophosphorylierung gebildet wird, nicht sofort wieder verbraucht wird. Die ATP-Pool-Messung wird nicht mehr in so hohem Maße durch verbrauchende Reaktionen überlagert. Abb. 11 gibt die polarographische Messung der Sauerstoffkonzentration in der Algensuspension nach Inkubation mit Methylviologen wieder. Bei Belichtung wird Methylviologen reduziert und anschließend sofort durch Sauerstoff oxidiert, wobei das Superoxid freigesetzt wird. Eine entsprechende Abnahme des Sauerstoffgehaltes der Zellen wird meßbar. In einem sekundären Schritt wird das Superoxid durch die Aktivität der Katalase abgebaut, wobei Wasser und Sauerstoff entstehen. Diese Rückreaktion steigert nun wiederum den Sauerstoffgehalt der Zellsuspension. Der Abfall der in Abb. 11 dargestellten Kurve nimmt während der Belichtung ständig ab. Er zeigt später denselben Wert wie der Abfall der Kurve beim Sauerstoffverbrauch durch die Atmung.

Die Reduktion von Methylviologen bei Belichtung ist durch NaN_3 und DCMU voll hemmbar (Abb. 31,33). Aus Vorversuchen zur ATP-Pool-Bestimmung wird ersichtlich, daß Methylviologen auch den Dunkel-

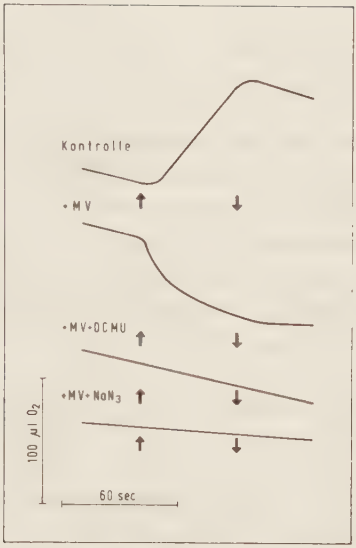

Abb. 11: Änderung der Sauerstoffkonzentration beim Dunkel-Licht-Wechsel zur 16. Std. des Entwicklungszyklus mit und ohne Hemmstoffzugabe. Dargestellt wird die mit einer Micro-Clark-Elektrode gemessene und von einem Oxygraph aufgezeichnete Änderung der Sauerstoffkonzentration von Zellen mit einer Suspensionsdichte von 10 µl PCV/ml o,o5 M Sörensenpuffer pH 7,0.
Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei DCMU 1 x 10^{-5} M, bei Methylviologen 2 x 10^{-3} M und bei NaN_3 5 x 10^{-3} M.
Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen $>$ 620 nm bei einer Lichtintensität von 2 x 10^5 erg/cm^2 · sec. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

ATP-Pool erniedrigt, d.h. die oxidative Photophosphorylierung stark einschränkt (Abb. 15/16).

Nach Erniedrigung des Dunkel-ATP-Pools und nach Hemmung des ATP-Verbrauchs durch den Calvinzyklus mit Methylviologen sollten die Voraussetzungen gegeben sein, nun die Photophosphorylierung zu messen, die durch den nicht-zyklischen Elektronentransport von der Wasserspaltung über beide Photosysteme induzierbar ist.

5.2. ATP-Pool-Bestimmungen bei Chlamydomonas reinhardii

5.2.1. Einfluß verschiedener Begasungsmodalitäten auf die Änderung des ATP-Pools bei Belichtung.

Es existieren verschiedene indirekte und direkte Methoden zur Bestimmung der photosynthetischen ATP-Bildungsrate (vgl. hierzu GIMMLER, 1977). Der ATP-Pool-Bestimmung an ganzen Zellen von Chlamydomonas reinhardii mit der Luciferin-Luciferase-Methode liegt die Annahme zugrunde, daß die ATP-bildenden und verbrauchenden Reaktionen bei einem Dunkel-Licht-Wechsel kurzfristig zeitlich auseinanderfallen bzw. daß bei Mangel an NADP kein ATP-Verbrauch durch den Calvinzyklus erfolgen kann.
Die Änderung des ATP-Pools bei Belichtung im Vergleich zum Dunkel-Pool wird als quantitatives Maß der ATP-Bildungsrate gewertet (SCHÄFER, 1975). Diese Annahme wird für das vorliegende System durch die Versuche bestätigt werden müssen.

Verglichen werden in den folgenden Experimenten die Licht-minus-Dunkel-Poolgrößen (Δ ATP-Werte). Der Dunkelwert errechnet sich aus drei kurz vor Belichtung entnommenen Proben. Der Lichtwert er-

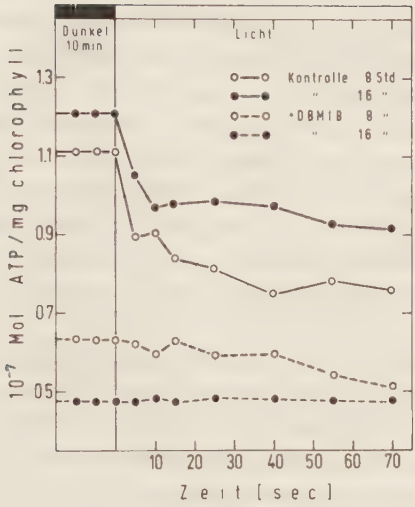

Abb. 12: ATP-Pooländerungen beim Dunkel-Licht-Wechsel in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben Versuchsbedingungen mit und ohne Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die DBMIB Endkonzentration betrug 5×10^{-5} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen > 620 nm und einer Intensität von 2×10^{5} erg/cm^2 . sec. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

rechnet sich aus dem mittleren ATP-Gehalt der Proben, die 5, 10 und 15 sec nach Belichtungsbeginn entnommen wurden. Der Vergleich so errechneter ATP-Pooldifferenzen untereinander wurde dem Vergleich zwischen der jeweiligen Steigung zwischen letzem Dunkelwert und erstem Lichtwert vorgezogen. Durch diesen Verrechnungsmodus sollen die durch zeitliche Abweichungen bei der Probenentnahme entstehenden Poolschwankungen besser gegeneinander ausgeglichen werden. Die Kinetik des ATP-Pools während der Meßzeit von 70 sec spiegelt dabei die regulatorischen Vorgänge in der Zelle wider.

Im Dunkeln baut Chlamydomonas reinhardii zur 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus jeweils einen sehr hohen Dunkel-ATP-Pool auf, der bei Belichtung durch sofort einsetzende ATP-verbrauchende Reaktionen auf ein niedrigeres Niveau abgesenkt wird (Abb. 12). Daß es sich hierbei um photosynthetische Reaktionen handelt, die für den Verbrauch von ATP verantwortlich sind, zeigt sich durch Anwendung von Photosynthese-Hemmstoffen wie DBMIB (Abb. 12), die den Abfall des ATP-Pools völlig unterbinden.

Ähnlich wie Chlamydomonas reinhardii verhalten sich bei Belichtung die meisten der bisher untersuchten Grünalgen, wie Scenedesmus obliquus (SCHÄFER, 1975; KLOB et al., 1971; KYLIN et al., 1974), Ankistrodesmus braunii (URBACH und GIMMLER, 1970$_b$) und Chlorella pyrenoidosa (BEDELL und GOVINDJEE, 1973). Blaugrüne Algen hingegen, wie Synechococcus lividus (BEDELL und GOVINDJEE, 1973) sowie Anacystis nidulans (BORNEFELD und SIMONIS, 1974) bauen im Dunkeln einen vergleichsweise sehr niedrigen Dunkel-ATP-Pool auf. Bei Belichtung regelt sich deren ATP-Pool auf ein höheres Niveau ein.

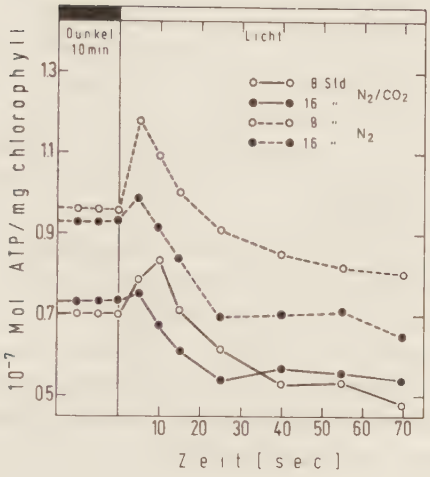

Abb. 13: ATP-Pooländerungen beim Dunkel-Licht-Wechsel in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter anaeroben Versuchsbedingungen.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit N_2 bzw. N_2 / CO_2 begast.
Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen $>$ 620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/ cm^2 . sec. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

Mit den für Chlamydomonas reinhardii gemessenen negativen △ATP-Werten (Abb. 12) kann keine Aussage über die Phosphorylierungsvorgänge in der Zelle gemacht werden. Die im folgenden beschriebenen Versuche zeigen eine Beziehung auf zwischen Dunkel-ATP-Pool und △ATP-Wert. Nur wenn die absoluten Poolhöhen unter einen bestimmten Wert absinken, können bei Belichtung positive △ATP-Werte gemessen werden. Wie aus den später angeführten Versuchen zu ersehen ist, hat die Poolhöhe unterhalb dieser Grenze jedoch keinen Einfluß auf die Höhe der ATP-Bildungsrate.
Sehr häufig werden ATP-Pool-Messungen unter Stickstoffbegasung vorgenommen.
Wäscht man den Sauerstoff aus der Algensuspension kontinuierlich mit einem N_2/CO_2 Gasgemisch aus, so wird die oxidative Phosphorylierung unterdrückt. Bei Belichtung steigt der ATP-Pool der 8. Std. des Entwicklungszyklus mehr oder minder stark für 5 - 10 sec an und fällt dann sehr steil auf ein niedrigeres Niveau ab (Abb. 13). Der in Abb. 29 aufgeführte △ATP-Wert wurde jedoch für die 16. Std. des Entwicklungszyklus nur aus dem ersten Meßwert nach Belichtung errechnet. Die in Abb. 13 dargestellten Versuche sind daher nicht geeignet, um Aussagen über die dabei ablaufende Rate der nichtzyklischen Photophosphorylierung zu machen.
Bei N_2-Begasung wird die Atmung durch Sauerstoffmangel und der nicht-zyklische Elektronentransport durch CO_2-Mangel unterdrückt. Der durch Belichtung verursachte Anstieg der ATP-Konzentration zur 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus ist deutlich steiler im Vergleich zu den mit N_2/CO_2 begasten Kulturen (Abb. 13). Der Verlauf der Kurve legt jedoch die Vermutung nahe, daß bereits nach 5 sec die ATP-Bildung durch

die verbrauchenden Reaktionen übertroffen wird. Da auch hierbei der $\triangle$ ATP-Wert der 16. Std. nur aus der ersten Probe (nach 5 sec Belichtungszeit) errechnet wurde, muß die Frage gestellt werden, ob die $\triangle$ ATP-Werte in diesem speziellen Fall exakte Aussagen machen können über die Photophosphorylierungsrate des zyklischen Elektronentransports.
Die Annahme, daß Stickstoffbegasung den nichtzyklischen Elektronentransport vollständig unterbindet bzw. daß dadurch der zyklische Elektronentransport begünstigt wird, ist weit verbreitet. Es sollte jedoch aufgrund von Untersuchungen, die ULLRICH (1972) veröffentlicht hat, betont werden, daß der lineare Elektronentransport durch Sauerstoff- und Kohlendioxid-Mangel nur unterdrückt, nicht jedoch gehemmt ist.
Um die Kapazität der Photophosphorylierung des PS II- als auch PS I-getriebenen Elektronenflusses getrennt voneinander messen zu können, reichen die erwähnten Begasungsmodalitäten offensichtlich nicht aus. Es hat sich daher als notwendig erwiesen, die Algen mit Hemmstoffen zu inkubieren, um die gewünschten Aussagen machen zu können

5.2.2. Simultane Messung der Änderung des ADP- und ATP-Pools beim Dunkel-Licht-Wechsel

Das zentrale Problem der ATP-Messung an Grünalgen ist der hohe Dunkel-ATP-Pool. Um positive $\triangle$ ATP-Werte messen zu können, ist es demnach unerläßlich, nicht nur die CO_2-Fixierung auszuschalten (durch Unterdrückung der NADP-Reduktion), sondern auch die Atmung zu drosseln

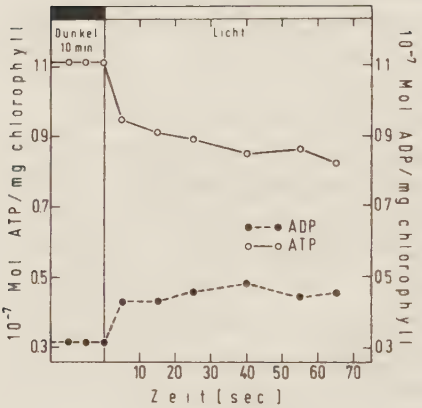

Abb. 14 : ATP- und ADP-Pooländerung beim Dunkel-Licht-Wechsel in Zellen der 8. Std des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben Versuchsbedingungen.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen >620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2 . sec.
Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

(durch Sauerstoffentzug oder Hemmstoffe). NaN_3 ist eine Substanz, die beide Notwendigkeiten erfüllt.
Es ist auch für Ankistrodesmus braunii (URBACH und GIMMLER, 1970a)und Scenedesmus obliquus (SCHÄFER, 1975) bekannt, daß unter aeroben Versuchsbedingungen der Licht-ATP-Pool relativ zum Dunkel-ATP-Pool ein niedrigeres Niveau einnimmt. Zu fragen ist nun, wie sich der ADP-Pool prozentual dazu verhält.
Aus Abb. 14 wird deutlich, daß sich, wie zu erwarten ist, ADP- und ATP-Pool beim Dunkel-Licht-Wechsel invers verhalten. Während der ATP-Pool sinkt, steigt der ADP-Pool an. Die Versuchsdauer beträgt 70 sec. An der ATP + ADP-Konzentration in den Zellen der 8. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii hat ATP im Dunkeln einen Anteil von 79% und im Licht von 63%. Das bedeutet, daß die ADP-Konzentration in den Zellen im Dunkeln sehr gering ist.
Dem stehen Messungen an Organismen anderer systematischer Gruppen gegenüber. Bei Anacystis nidulans, einer blaugrünen Alge, sind die ATP (55%) und ADP (45%) Konzentration im Dunkeln annähernd gleich groß. Bei Belichtung steigt der ATP-Pool sofort auf ein hohes Niveau an (BORNEFELD und SIMONIS, 1974). Bei Chloroplasten verschiedener höherer Pflanzen ist im Dunkeln die ADP-Konzentration größer als die ATP-Konzentration. Bei Belichtung steigt der ATP-Spiegel ebenfalls sofort auf ein höheres Niveau an (KAISER und URBACH, 1973; SARTORIUS und HEBER, 1965).
ADP und ATP-Spiegel zeigen jeweils ein inverses Verhalten beim Dunkel-Licht-Wechsel.
Durch die simultane Messung des ADP- und ATP-Pools beim Dunkel-Licht-Wechsel konnte für Chlamydomonas reinhardii festgestellt werden, daß

der Dunkel-ATP-Pool nicht nur relativ zum Lichtwert, sondern auch in seiner absoluten Konzentration sehr hoch ist. Ein Anstieg des ATP-Pools kurz nach der Belichtung wäre daher schon aus den physiologischen Gegebenheiten schlecht möglich. Die dazu erforderliche ADP-Reserve wurde bereits im Dunkeln durch die Atmung zum ATP phosphoryliert. Um positive $\triangle$ ATP-Werte bei Belichtung messen zu können, muß das im Dunkeln von der Zelle aufgebaute physiologische ATP/ADP-Gleichgewicht dahingehend verändert werden, daß durch Absenken des ATP-Pools der ADP-Pool angehoben wird.

5.2.3. Wirkung von Hemmstoffen auf den Dunkel-ATP-Pool

Der Gesamt-ATP-Pool intakter Algenzellen unterliegt einer wirkungsvollen Regulation. Chloroplasteninnenraum und Cytoplasma stehen im Dunkeln und bei Belichtung in einem energetischen Gleichgewicht, wobei das eine Mal die Atmung, das andere Mal primär die Photosynthese die Reduktions- und Energieäquivalente zur Verfügung stellt (SELLAMI, 1976).
Der direkte Transport von Nucleotiden über die Chloroplastenmembran ist nur in unzureichenden Raten möglich. Es konnte jedoch ein Mechanismus für den indirekten Transport aufgedeckt werden. Zusammenfassende Artikel hierüber sind von HELDT (1976) sowie KRAUSE und HEBER (1976) veröffentlicht worden.
Durch teilweise oder totale Hemmung der oxidativen Phosphorylierung ist es möglich, den Gesamt-ATP-Pool der Zelle und damit auch den ATP-Pool des Chloroplastenstromas zu erniedrigen. Eine bedingte Ausschaltung der oxidativen Phos-

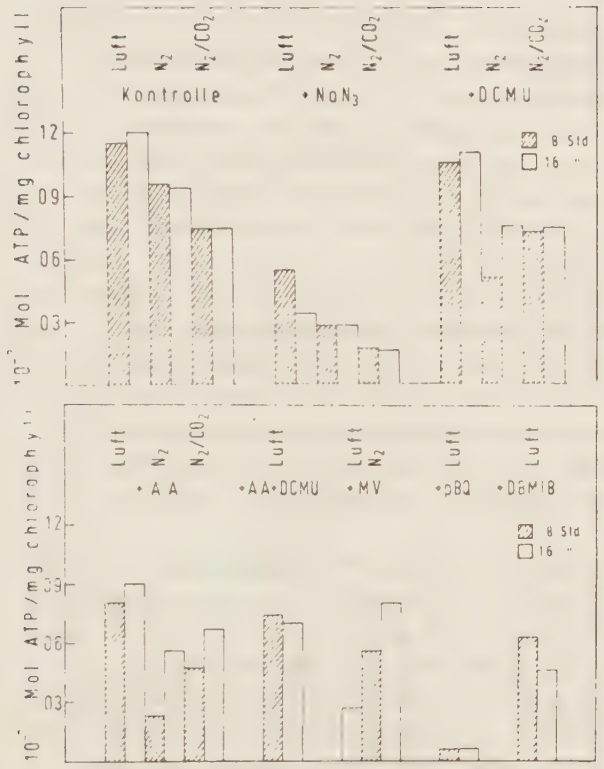

Abb. 15/16
ATP-Pool im Dunkeln nach Inkubation mit Hemmstoffen unter aeroben und anaeroben Versuchsbedingungen in Zellen der 8.Std und 16.Std des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii. Proben einer Zelldichte von 2µl PCV/ml Nährlösung wurden vor der Messung 10 min im Dunkeln begast und zu Beginn der Begasung mit Hemmstoffen versetzt:

NaN_3:	5×10^{-3} M	Endkonzentration
DCMU:	1×10^{-5} M	"
AA:	1×10^{-4} M	"
MV:	2×10^{-3} M	"
p-BQ:	4×10^{-4} M	"
DBMIB:	5×10^{-5} M	"

Die Begasung erfolgte mit Preßluft bzw N_2 oder N_2/CO_2. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb.4.

phorylierung war aus zwei Gründen für die Versuchsdurchführung erforderlich. Zum einen konnte ein möglicher Anteil der oxidativen Phosphorylierung an dem während der Belichtung gebildeten ATP-Pool ausgeschlossen werden. Zum anderen ist es für die verwendeten Algen erst bei erniedrigtem Dunkel-ATP-Pool möglich, positive Dunkel-minus-Licht-Werte ($\triangle$ATP-Werte) zu ermitteln.

In Abb. 15/16 ist die Wirkung der in der Arbeit beschriebenen Hemmstoff-Kombinationen auf den Dunkel-ATP-Pool dargestellt. Die Probenentnahme für die Poolbestimmung erfolgte jeweils nach 10-minütiger Dunkelphase, in der die Algen wie beschrieben (Kap. 4.7.2.)mit Gas durchperlt und gegebenenfalls mit Hemmstoffen inkubiert wurden.

Verglichen werden Zellen von Chlamydomonas reinhardii der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus.

Unter aeroben Bedingungen liegen der Dunkel-ATP-Pool der 8. Std. und 16. Std. etwa auf dem gleichen Niveau. Die Atmung reguliert demnach im Dunkeln den Gesamt-ATP-Pool während des Entwicklungszyklus auf ein fast konstantes Niveau ein.

Stickstoffbegasung beeinträchtigt die oxidative Phosphorylierung durch Erniedrigung der Sauerstoffkonzentration. Der Dunkel-ATP-Pool kann damit auf 80% des Vergleichswertes gesenkt werden. Begast man die Kultur mit einem N_2/CO_2-Gasgemisch, so wird der CO_2-Gaswechsel der Mitocondrien sowohl durch Sauerstoffmangel als auch durch eine gesteigerte CO_2-Konzentration unterdrückt. Der ATP-Pool sinkt auf 60% des mit Luft begasten Pools herab.

NaN_3 ist ein Hemmstoff der Atmungskette und der

Photosynthese. NaN_3 wurde in der für die Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes optimalen Konzentration von 5×10^3 M eingesetzt. Die teilweise Hemmung der Atmung bedingt eine Erniedrigung des Dunkel-ATP-Pools in der 8. Std. auf 48% und in der 16. Std. auf 27% im Vergleich zu den nicht mit Hemmstoff inkubierten aeroben Kulturen. Unter N_2 bzw. N_2/CO_2-Begasung sinkt der Dunkel-Pool der mit NaN_3 versetzten Algen auf ca. 27% der jeweiligen Kontrollwerte zur 8. Std. und 16. Std. herab.
DCMU, das die photosynthetische Sauerstoffproduktion hemmt, beeinflußt den Dunkel-ATP-Pool unter aeroben Versuchsbedingungen kaum. Unter anaeroben Versuchsbedingungen wird der Dunkel-ATP-Pool zur 8. Std. auf 53% und zur 16. Std. auf 81% der Werte erniedrigt, die meßbar sind für Kontrollkulturen, welche nicht mit Hemmstoff inkubiert, jedoch mit N_2 bzw. N_2/CO_2 begast wurden.

Weitere Hemmstoffe, die verwendet wurden, sind Antimycin A, welches die Atmung zwischen Cytochrom b und Cytochrom c blockiert, DBMIB, welches als Antagonist von Plastochinon in der Elektronentransportkette agiert, und Methylviologen, ein artifizieller Elektronenakzeptor nach Photosystem I. Sie alle beeinflussen den Dunkel-ATP-Pool. Es ist jedoch nur p-Benzochinon in der Lage, den Gaswechsel der Mitochondrien total zu blockieren und damit eine fast vollständige Entleerung des ATP-Pools zu bewirken.

5.2.4. PS II getriebene Photophosphorylierung

5.2.4.1. Charakterisierung der PS II getriebenen Photophosphorylierung

An Chloroplasten konnte nachgewiesen werden, daß der Elektronentransport von der Wasserspaltung über PS II zu Hill-Reagentien, die vor PS I reduziert werden, mit einer ATP-Bildung gekoppelt ist (BÖHME und TREBST, 1969; IZAWA et al., 1973; TREBST und REIMERS, 1973).
Die nach MITCHELL für die ATP-Bildung notwendige Protonenfreisetzung erfolgt durch die Wasserspaltung.
p-Benzochinon ist eines der Hill-Reagentien, das auch bei intakten Zellen in den Chloroplasten eindringt. Bei Belichtung reduzieren die von PS II angeregten Elektronen das Hill-Reagenz anstelle einer Komponente der Elektronentransportkette. GIMMLER (1973) konnte für ganze Zellen von Dunaliella parva nachweisen, daß der Elektronentransport von der Wasserspaltung zum p-Benzochinon mit einer Energiekonservierung gekoppelt ist. Ein Elektronenfluß zum PS I war zusätzlich durch DBMIB-Inkubation verhindert worden.
Versetzt man eine Zellsuspension von Chlamydomonas reinhardii mit p-Benzochinon, so wird die Atmung gehemmt und der Dunkel-ATP-Pool fast völlig entleert (Abb. 16).
Bei Belichtung steigt der ATP-Pool innerhalb von 5 sec. auf ein höheres Niveau an, das während der Meßzeit kaum Schwankungen unterlegen ist (Abb. 17).
Wie aus dem Blockdiagramm (Abb. 19) zu ersehen ist, liegt der für die 16.Std.gemessene $\triangle$ ATP Wert um 65 % niedriger als der für die 8. Std. gemes-

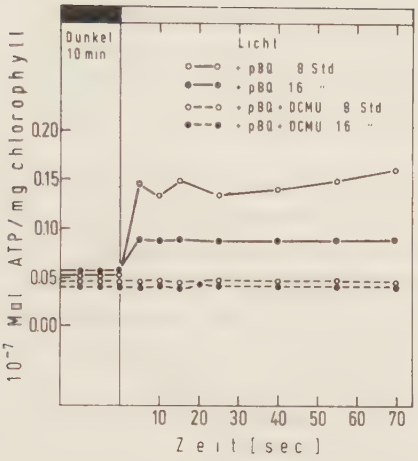

Abb. 17: ATP-Pooländerungen der PS II getriebenen Photophosphorylierung beim Dunkel-Licht-Wechsel in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 5 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei p-Benzochinon 4 x 10^{-4} M und bei DCMU 1 x 10^{-5} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen > 620 nm und einer Intensität von 2 x 10^{5} erg/cm^2 · sec. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

sene Wert. Diese ATP-Bildung kann, wie aus Abb. 17 zu ersehen ist, vollständig mit DCMU gehemmt werden. DCMU wird als Photosynthesehemmstoff beschrieben, der den Elektronenfluß von PS II zu PS I vor Plastochinon unterbindet (BISHOP,1968). Das Versuchsergebnis kann als Beweis dafür angesehen werden, daß die Reaktion von PS II getrieben wird.

Nimmt man an, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur die Wasserspaltung, nicht aber Plastochinon als Energiekonservierungsstelle fungieren kann, so sollte die ATP-Bildung nicht durch DBMIB hemmbar sein. Messungen an Chloroplasten bestätigen diese Annahme (Zusammenfassung siehe HAUSKA und TREBST, 1977).

In Abb. 18 ist die Wirkung von DBMIB auf die Photosystem II-getriebene Photophosphorylierung von Chlamydomonas reinhardii dargestellt. DBMIB hemmt demnach die Photophosphorylierung zur 8. Std. um 12% und zur 16. Std. um 10%. Das Verhältnis der $\triangle$ ATP-Werte von 8. Std. und 16. Std. wird durch den Hemmstoff jedoch nicht verändert (Abb. 19).

Nach TREBST et al. (1970) besteht die Hemmwirkung des DBMIB darin, als Antagonist von Plastochinon die Elektronen von PS II abzufangen und damit die Oxidation von Plastochinon durch PS I zu verhindern. Die genaue Angriffsstelle von p-Benzochinon ist nicht bekannt, sollte jedoch nach IZAWA et al. (1973) vor Plastochinon liegen. GIMMLER (1973) postuliert demgegenüber die Beteiligung von Plastochinon am Elektronentransport zu p-Benzochinon, schreibt diesem Schritt jedoch keine Energiekonservierung zu.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß p-Benzochinon vor der eigentlichen DBMIB-

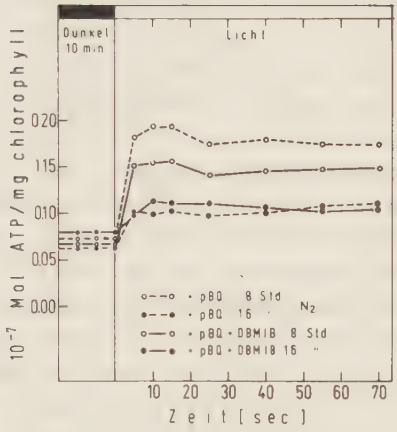

Abb. 18: ATP-Pooländerungen der PS II getriebenen Photophosphorylierung beim Dunkel-Licht-Wechsel in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben bzw. anaeroben Versuchsbedingungen und Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 5 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft bzw. N_2 begast. Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei p-Benzochinon 4 x 10^{-4} M und bei DBMIB 5 x 10^{-5} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen $>$ 620 nm und einer Intensität von 2 x 10^5 erg/cm^2 · sec. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

Hemmstelle reduziert wird, und daß Plastochinon nicht an der mit Photosystem II gekoppelten Phosphorylierung beteiligt ist. Die Hemmbarkeit der Reaktion durch DCMU unterstreicht die Funktion der Wasserspaltung als einziger Energiekonservierungsstelle dieser Teilreaktion.
Die an und für sich erstaunliche Beobachtung, daß NaN_3, ein Hemmstoff der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung, die p-Benzochinon Hill-Reaktion nicht hemmt, den ATP-Pool bei Belichtung also nicht beeinflußt (Abb. 19) ist durch die chemische Unverträglichkeit der Hemmstoffe miteinander zu erklären. In einem Reganzglasversuch kann beobachtet werden, daß bei Zugabe von NaN_3 zu einer wässrigen p-Benzochinon-Lösung diese sich von gelb über rot nach braun verfärbt, was als Anzeichen einer Polymerisation von p-Benzochinon gewertet werden muß.
Wie aus Abb. 18 zu ersehen ist, wird die ATP-Poolgröße durch Stickstoffbegasung beeinflußt. Der ATP-Wert der 8. Std. und 16. Std. liegt unter anaeroben Bedingungen um 21% über dem Wert der für die Versuche unter aeroben Bedingungen bestimmt worden ist. Zugabe von DCMU hemmt die PS II-getriebene ATP-Bildung unter anaeroben Bedingungen vollständig (Abb. 19). Die beschriebenen Versuche geben keinen Hinweis darauf, aus welchen Gründen der ATP-Pool durch Stickstoffbegasung bzw. durch Erniedrigung der Sauerstoffkonzentration gesteigert werden kann.

5.2.4.2. Abhängigkeit der Größe des $\triangle$ATP-Wertes vom Entwicklungsstadium der Zellen.

Wenn, wie gezeigt, die Photosystem II-Aktivität, gemessen als p-Benzochinon-Hill-Reaktion, mit einer Energiekonservierung gekoppelt ist,

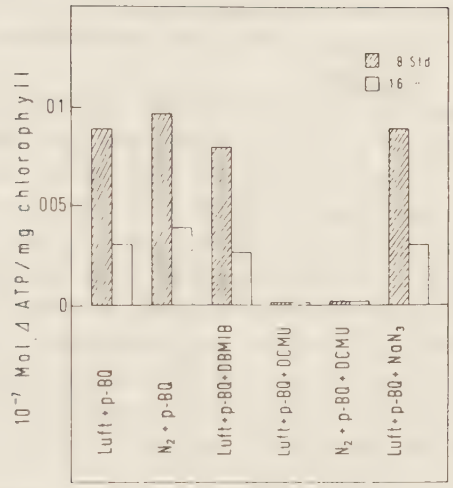

Abb. 19:

△ATP-Werte der PS II getriebenen Photophosphorylierung beim Licht-Dunkel-Wechsel für Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben und anaeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 5 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft bzw N_2 begast. Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei

DBMIB	5×10^{-5} M
DCMU	1×10^{-5} M
NaN_3	5×10^{-3} M
p-BQ	4×10^{-4} M

Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen >620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2 · sec. Die △ATP-Werte wurden nach dem in Kap. 5.2.1 beschriebenen Verfahren ermittelt. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

so sollte diese den Schwankungen der Hill-Reaktion während des Entwicklungszyklus parallel laufen.
Es wurden deshalb ATP-Pool-Messungen im Abstand von 4 Std. über den Entwicklungszyklus vorgenommen. In Abb.20 sind die △ATP-Werte der Messungen eingetragen. Die Werte zeigen, wie auch die p-Benzochinon-Sauerstoffmessungen in Abb. 4,ein Maximum zur Mitte der Lichtzeit und ein Minimum zu Beginn der Dunkelzeit. Der △ATP-Wert sinkt von der 8. Std. zur 16. Std. des Entwicklungszyklus um 65% ab. Die als Sauerstoffproduktion gemessene p-Benzochinon-Hill-Reaktion zeigt eine Erniedrigung von der 8. zur 16. Std. um 60%.

Ein Vergleich von ATP-Poolgröße und Sauerstoffproduktion weist für die 4. und 12. Std. des Entwicklungszyklus keine solchen engen Beziehungen auf. Beide Bestimmungsmethoden sind für die 8.Std. und 16. Std. jedoch durch eine Vielzahl von Versuchen über weite Zeiträume wiederholt und damit statistisch abgesichert worden. Da das Verhältnis der△ ATP-Werte von 8.Std. zu 16. Std. von 65% weder durch Stickstoffbegasung noch DBMIB-Hemmung zu beeinflussen ist, wird es als zuverlässig angesehen. Es kann daher als gesichert gelten, daß die PS II-getriebene Phosphorylierung und die ebenfalls mit p-Benzochinon gemessene Sauerstoffentwicklung des wasserspaltenden Systems in relativ eng zu fassendem Rahmen miteinander gekoppelt sind. Die durch die Wasserspaltung zu verschiedenen Stunden des Entwicklungszyklus jeweils aufgebaute protomotive force wird zur ATP-Bildung ausgenutzt.

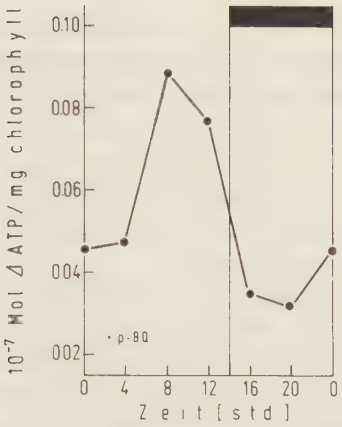

Abb. 20: Änderung der △ ATP-Werte der PS II getriebenen Photophosphorylierung über den Entwicklungszyklus einer Synchronkultur von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben Versuchsbedingungen.
Die Zellen wurden im Wechsel von 14 Std. Licht (20.000 Lux) zu 10 Std. Dunkel bei 30°C unter Begasung mit 3% CO_2 in Luft synchronisiert.
Proben mit einer Zelldichte von 5 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die p-Benzochinon Endkonzentration betrug 4 x 10^{-4} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen > 620 nm und einer Intensität von 2 x 10^5 erg/cm^2 · sec. Die △ ATP-Werte wurden nach dem in Kap. 5.2.1 beschriebenen Verfahren ermittelt.

5.2.4.3. Abhängigkeit der Größe des △ ATP-Wertes von der Lichtintensität

Wenn bei Belichtung die ATP-Poolgröße und die ATP-Bildungsrate in einem Zusammenhang stehen, müßte es möglich sein, eine Lichtintensitätskurve für die △ ATP-Werte aufzustellen.
In Abb. 21 ist für die 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus die Differenz vom Dunkel- zum Licht-ATP-Pool in Abhängigkeit von der Lichtintensität aufgetragen.
Die Lichtsättigung der △ ATP-Werte wird bei Intensitäten erreicht, bei denen auch die Photosynthesekapazität und die CO_2-Fixierungskapazität in den sättigenden Bereich übergehen (Abb.7,8).Positive △ ATP-Werte können jedoch erst bei 4 - 6 x 10^3 erg/cm^2 sec gemessen werden. Ob das,wie BEDELL und GOVINDJEE (1973) sowie AVRON und NEUMANN (1968) fordern, mit einer lag-Phase bei der ATP-Bildung zu erklären ist, oder ob die Bestimmung geringerer Pool-Differenz mit der hier verwandten Meßmethode nicht mehr möglich ist, kann aus den gewonnenen Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

5.2.4.4. Vergleich der gewonnenen Ergebnisse

Aus den Versuchen kann geschlossen werden, daß der an Chlamydomonas reinhardii untersuchte photosynthetische Elektronentransport von der Wasserspaltung über PS II zu p-Benzochinon sowohl mit einer Sauerstoffentwicklung als auch mit einer ATP-Bildung gekoppelt ist. Die ATP-Pool-Bildung ist PS II-Licht getrieben und verläuft parallel der Sauerstoffentwicklung (vergl. hierzu FRICKEL-FAULSTICH, 1974; SENGER, 1978). Sie ist mit DCMU hemmbar und wird durch

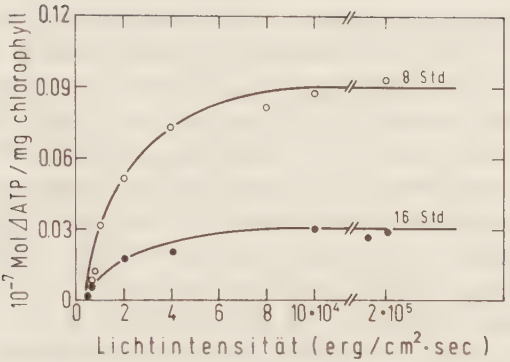

Abb 21: Abhängigkeit der Größe der △ATP-Werte der PS II getriebenen Photophosphorylierung von der Lichtintensität in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben Versuchsbedingungen bei Zugabe von p-Benzochinon.
Proben mit einer Zelldichte von 5 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die p-Benzochinon Endkonzentration betrug 4 x 10^{-4} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen $>$ 620 nm. Die △ATP-Werte wurden nach dem in Kap. 5.2.1 beschriebenen Verfahren ermittelt.
Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

DBMIB geringfügig beeinflußt, so daß geschlossen werden darf, daß Plastochinon nicht an der Energiekonservierung beteiligt ist.
Von SENGER und FRICKEL-FAULSTICH (1974) konnte an Chlamydomonas reinhardii nachgewiesen werden, daß die Rate des Elektronentransportes und damit auch die Schwankungen der Aktivität der Photosysteme während des Entwicklungszyklus reguliert wird durch die Reoxidation von Plastochinon.
Es sollte demzufolge auch eine Beteiligung von Plastochinon an der Regulation der PS II getriebenen Photophosphorylierung über den Entwicklungszyklus angenommen werden.
Während einerseits für die Regulation der PS II abhängigen △ ATP-Werte eine Beteiligung von Plastochinon angenommen wird (SENGER und FRICKEL-FAULSTICH, 1974), ist andererseits aus den beschriebenen Versuchen eine Beteiligung von Plastochinon an der PS II getriebenen Energiekonservierung auszuschließen. Die DBMIB-Insensitivität der Reaktion und die Größe des absoluten △ATP-Wertes sind ein Beweis für diese Annahme.
Es wäre demnach entsprechend der Mitchell-Hypothese zu fordern, daß die von Plastochinon über die Thylakoidmembran transferierten H^+-Ionen stöchiometrisch zur Protonierung von p-Benzochinon aufgebraucht werden, so daß mit der Reaktivität von Plastochinon keine Energiekonservierung gekoppelt ist.
Aufgrund der Ergebnisse kann angenommen werden, daß unter den Bedingungen eines niedrigen Dunkel-ATP-Pools die Auslenkung des Licht-ATP-Pools als Maß für die ATP-Bildungsrate von in vivo Messungen der PS II getriebenen Photophosphorylierung von Chlamydomonas reinhardii herangezo-

gen werden kann. Sowohl die Abhängigkeit der Pool-Höhe von der Lichtintensität, als auch von der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung unterstützen diese Annahme.

5.2.5. PS I-getriebene Photophosphorylierung

5.2.5.1. Nachweis einer PS I-getriebenen zyklischen Photophosphorylierung unter aeroben Versuchsbedingungen

An ganzen Algen ist eine PS I-getriebene zyklische Photophosphorylierung in vivo, d.h. ohne Zusatz von Kofaktoren, häufig nachgewiesen worden (vergl. Einleitung). Die zyklische Photophosphorylierung wird im allgemeinen unter anaeroben Versuchsbedingungen gemessen. Es soll im folgenden untersucht werden, ob Anaerobiose nur eine methodische Notwendigkeit ist, um die zyklische Photophosphorylierung von anderen Phosphorylierungsschritten zu unterscheiden, und ob Sauerstoff prinzipiell einen zyklischen Elektronentransport verhindert.

Wie Aus Abb. 15/16 hervorgeht, wird unter aeroben Versuchsbedingungen im Dunkeln ein hoher ATP-Pool aufgebaut, der durch DCMU-Zugabe nur wenig beeinflußt wird. Bei Belichtung steigt der ATP-Pool in Gegenwart von DCMU für 1o sec geringfügig an und pendelt sich dann in Zellen der 16. Std. ungefähr auf dem Dunkelwert ein, während er in Zellen der 8. Std. langsam und kontinuierlich abfällt (Abb. 23).Welchen Anteil dabei die zyklische Photophosphorylierung und welchen die oxidative Phosphorylierung leisten, kann aus den vorliegenden Daten nicht bestimmt werden. Das kurze Überschießen des ATP-Pools könnte als Hinweis dafür gewertet werden,

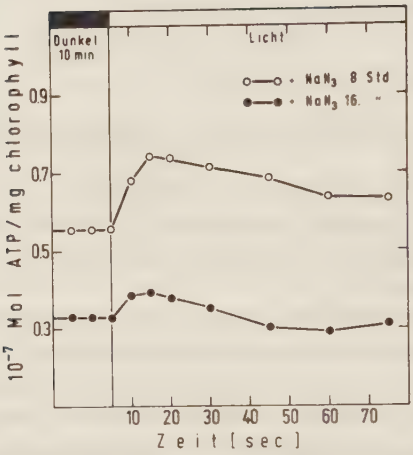

Abb. 22: ATP-Pool-Änderungen der PS I getriebenen Photophosphorylierung beim Dunkel-Licht-Wechsel in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben Versuchsbedingungen mit Hemmsoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die NaN_3 Endkonzentration betrug 5×10^{-3} M.
Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen >620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2 sec. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

daß eine PS I-getriebene Photophosphorylierung stattfindet, die in diesem Fall jedoch starken Regulationsmechanismen unterliegt, so daß ein Ansteigen des ATP-Pools bei Belichtung nicht möglich ist. Im Gegensatz zu diesem Versuchsansatz, wo ATP-Verbrauch und ATP-Bildung auf annähernd gleichgroße Umsatzraten einreguliert sind, wird ohne Hemmstoffzugabe der ATP-Pool bei Belichtung durch hohen ATP-Verbrauch sofort auf ein niedrigeres Niveau abgesenkt (Abb. 12).

Da bei hohem Dunkel-ATP-Pool ein positiver $\triangle$ ATP-Wert und somit eine mögliche zyklische Photophosphorylierung nicht meßbar sind, wurde ein Hemmstoff eingeführt, der wie DCMU die photosynthetische Sauerstoffentwicklung hemmt, und der gleichzeitig auch durch Drosselung der Atmung die Einstellung eines niedrigen Dunkel-ATP-Pools bedingt.
Versetzt man eine Zellsuspension von Chlamydomonas reinhardii im Dunkeln mit NaN_3 bei einer Mindest-Inkubationszeit von 10 min, so wird der Dunkel-ATP-Pool stark erniedrigt (Abb. 15/16). Bei Belichtung steigt der Pool zur 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus ca. 10 sec lang an und fällt dann sehr langsam wieder ab (Abb. 22). Die resultierenden $\triangle$ ATP-Werte hierfür sind in Abb. 24 dargestellt. Für die 16. Std. des Entwicklungszyklus wird demnach ein im Vergleich zur 8. Std. um 67% erniedrigter Wert bestimmt. Zu beiden Zeiten des Entwicklungszyklus wird der aufgebaute ATP-Pool kontinuierlich erniedrigt durch einen im Vergleich zur ATP-Bildung höheren ATP-Verbrauch. Die Versuche zeigen, daß es nach Erniedrigung des Dunkel-ATP-Pools durch Hemmung der Atmung möglich ist, auch unter aeroben Versuchsbedingungen für Chlamydomonas

reinhardii eine zyklische Photophosphorylierung nachzuweisen.
DCMU, ein Hemmstoff, der den zyklischen Elektronentransport vor Plastochinon unterbricht (BISHOP, 1958), hat keine Wirkung auf die nach Inkubation mit NaN_3 erfolgende Erniedrigung des Dunkel-ATP-Pools der Zellen. Es beeinflußt jedoch geringfügig den bei Belichtung von der Zelle aufgebauten ATP-Pool (Abb. 23) in dem Sinne, daß der $\triangle$ ATP-Wert zur 16. Std. um 30% über dem Kontrollwert liegt, der nur mit NaN_3 bestimmt wurde, und daß zur 8. Std. des Entwicklungszyklus durch zusätzliche Inkubation mit DCMU die ATP-Pool-Höhe statt langsam abzufallen, stetig ansteigt.
Die Differenz der $\triangle$ ATP-Werte von der 8. Std. zur 16. Std. wird damit auf 50%reduziert (Abb. 24).
Möglicherweise sind durch DCMU-Zugabe die ATP-verbrauchenden Reaktionen in der Zelle einer anderen Regulation unterworfen, so daß es im Vergleich zum Kontrollversuch, bei dem die Algen nur mit NaN_3 inkubiert wurden, zu einer Beeinflussung der Pool-Höhen kommen kann.
Von HUBER und EDWARDS (1975) wird diskutiert, daß DCMU prinzipiell die zyklische Photophosphorylierung steigert. Die beobachtete Wirkung von DCMU auf die zyklische Photophosphorylierung von Chlamydomonas reinhardii könnte so auch als ein Effekt auf die ATP-Bildugnsrate erklärt werden.
Aus den Versuchen ist zu folgern, daß nach Erniedrigung des Dunkel-ATP-Pools und nach Hemmung der Wasserspaltung durch den zyklischen Elektronentransport eine Photophosphorylierung ausgelöst wird. Diese ist nicht DCMU hemmbar

und wird demnach nur durch PS I-Licht getrieben. Für Anacystis (BORNEFELD et al., 1972) und Ankistrodesmus (URBACH und GIMMLER, 1970b) konnte ebenfalls eine zyklische Photophosphorylierung unter Luft / CO_2-Begasung gemessen werden.

5.2.5.2. Hemmung der zyklischen Photophosphorylierung

Die Auswirkungen einer Inkubation von Chlamydomonas reinhardii mit NaN_3 sind zwar offensichtlich, der genaue Angriffspunkt der Hemmwirkung ist jedoch unklar. Zur Absicherung der Versuchsergebnisse soll deshalb ein unter anderen Gesichtspunkten diskutierter Versuch als Nachweis dafür herangezogen werden, daß die beschriebene Photophosphorylierung durch einen zyklischen Elektronentransport verursacht wird (Kap 5.2.7.). Nach GALSTON (1955) hemmt NaN_3 die Katalase, so daß H_2O_2 in der Zelle angereichert werden kann. H_2O_2 soll nicht nur die Wasserspaltung hemmen (FORTI und GEROLA, 1977), sondern es soll auch als artifizieller Donator Elektronen in PS II einfüttern. Es wäre dann trotz Ausschaltung der Wasserspaltung ein nicht-zyklischer Elektronenfluß zum NAPD mit gekoppelter Phosphorylierung meßbar (INOUE und NISHIMURA, 1971; HAMLIN et al., 1975). In den Chloroplasten (SCHOR et al.,1971; CURTIS et al., 1975; BRAND et al., 1975; SENGER, 1978) als auch den ganzen Zellen von Chlamydomonas reinhardii (Kap. 5.2.7.) kann der physiologische Endakzeptor des nicht-zyklischen Elektronentransportes durch Methylviologen ersetzt werden. Der nicht-zyklische Elektronentransport bleibt auf diese Weise aufrechterhalten. Ein

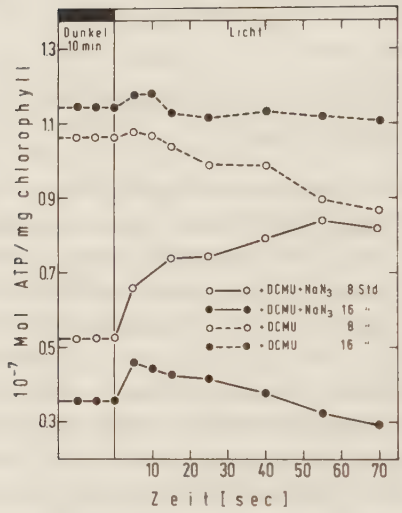

Abb. 23: ATP-Pooländerungen der PS I getriebenen Photophosphorylierung beim Dunkel-Licht-Wechsel in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei DCMU 1 x 10^{-5} M und bei NaN_3 5 x 10^{-3} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen > 620 nm und einer Intensität von 2 x 10^5 erg/cm^2 · sec.
Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

zyklischer Elektronentransport wird dadurch unterbrochen, daß Methylviologen noch vor dem Akzeptor der zyklischen Elektronentransportkette von PS I reduziert wird (STROTMANN und v.GÖSSELN,1971).
Versetzt man die mit NaN_3 inkubierte Zellsuspension von Chlamydomonas reinhardii mit Methylviologen, so kann durch Belichtung keine Steigerung der ATP-Poolgröße hervorgerufen werden. (Abb. 30). Methylviologen oxidiert die Elektronentransportkette und verhindert so einen zyklischen Transport der Elektronen um PS I.

Der Versuch ist ein Nachweis dafür, daß nach Hemmung der Wasserspaltung mit NaN_3 ein zyklischer Elektronentransport die ATP-Bildung auslöst. Möglicherweise fördert NaN_3 die Anreicherung von H_2O_2 in der Zelle. Dieses ist jedoch nicht in der Lage, als artifizieller Elektronendonator einen nicht-zyklischen Elektronentransport bei Chlamydomonas reinhardii in Gang zu setzen.
Weitere Substanzen, die auf die zyklische Photophosphorylierung Einfluß nehmen und die aufgrund der ihnen zugeschriebenen Angriffsstelle auch den Verlauf des zyklischen Elektronentransports aufklären könnten, sind Antimycin A und DBMIB.
Die Wirkungsweise von Antimycin A hat sich als so komplex erwiesen, daß diese Versuche in Kap.5.2.9. gesondert diskutiert werden sollen.

In Abb. 24 ist die Wirkung von DBMIB auf die zyklische Photophosphorylierung dargestellt. Die nach Hemmung der Wasserspaltung mit NaN_3 unter aeroben Versuchsbedingungen meßbare zyklische Photophosphorylierung wird durch DBMIB

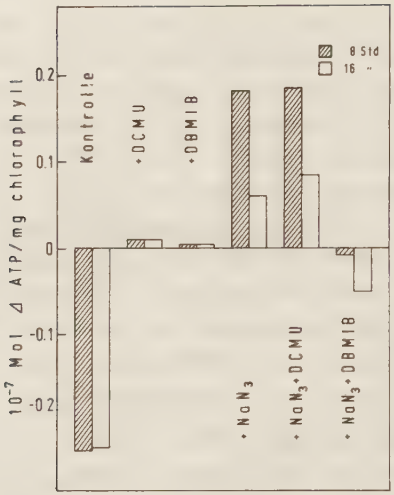

Abb. 24:

△ATP-Werte der Gesamt- Photophosphorylierung und der PS I getriebenen Photophosphorylierung beim Dunkel-Licht-Wechsel für Zellen der 8.Std und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben Versuchsbedingungen mit und ohne Hemmstoffzugabe. Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei

DCMU	1×10^{-5} M
DBMIB	5×10^{-5} M/ 1×10^{-4} M
NaN_3	5×10^{-3} M

Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen $\geq$620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2. sec. Die △ATP-Werte wurden nach dem in Kap.5.2.1. beschriebenen Verfahren ermittelt. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

vollständig unterdrückt. Abb. 12 zeigt, daß auch die nicht-zyklische Photophosphorylierung dieser Algen durch DBMIB unterbrochen wird.

Die Hemmung der DCMU-resistenten zyklischen Photophosphorylierung von Chlamydomonas reinhardii durch DBMIB deutet darauf hin, daß Plastochinon eine essentielle Komponente sowohl des nicht-zyklischen als auch des zyklischen Elektronentransportes ist. Die beiden möglichen Elektronentransport-Wege der Photosynthese durchlaufen eine gemeinsame Energiekonservierungsstelle, das Plastochinon. Diese Beobachtung stimmt mit den an Chloroplasten (BÖHME und REIMERS, 1971; TREBST et al., 1970; URBACH und KAISER, 1972)und intakten Algen (GIMMLER, 1973; SCHÄFER, 1975; SUNDBERG et al., 1976) gewonnenen Ergebnissen überein.
Für die Hemmung des zyklischen Elektronentransports ist jedoch eine höhere DBMIB-Konzentration erforderlich als für die Hemmung des nicht-zyklischen Elektronentransportes. Im einen Fall werden Konzentrationen von 1×10^{-4} M, im anderen Fall von 5×10^{-5} M benötigt, um eine komplette Hemmung hervorzurufen. FORTI und ROSA (1971) schlossen aus dieser auch an Chloroplasten gemachten Beobachtung, daß Plastochinon nicht am zyklischen Elektronentransport beteiligt ist. SUNDBERG et al., (1976) bauen auf solchen Befunden für Scenedesmus obliquus die Hypothese auf, daß der zyklische Elektronentransport und der nicht zyklische Elektronentransport verschiedene Teile des Plastochinonpools zur Photophosphorylierung ausnutzen.
Setzt man voraus, daß der beobachtete Effekt nicht auf die Unverträglichkeit von NaN_3 und DBMIB zurückzuführen ist (s.a. Kap.5.2.4.1),

so sollten physiologische Vorgänge dieser Beobachtung zugrunde liegen.

5.2.5.3.Abhängigkeit der Größe des△ ATP-Wertes vom Entwicklungsstadium der Zellen

Wie bereits erläutert, liegen der△ ATP-Wert der PS I getriebenen Photophosphorylierung in Zellen der 16. Std. des Entwicklungszyklus um 67% unter dem Wert der Zellen der 8. Std.(Abb. 24). Um eine Aussage über die Kopplung von PS I getriebenem Elektronentransport mit der Photophosphorylierung machen zu können, wurde der ATP-Pool der PS I getriebenen Photophosphorylierung über den Entwicklungszyklus bestimmt. Wie aus Abb. 25 zu ersehen ist, hat der△ ATP-Wert ein Maximum zur Mitte der Lichtzeit und ein breites Minimum in der Zeit von etwa der 12. Std. bis zur 16. Std. des Entwicklungszyklus. Danach steigt der△ ATP-Wert wieder an.

Die Aktivität des Teils der Elektronentransportkette, die vom PS I getrieben wird, kann auch als Elektronenfluß vom Asc./DCPIP zum Methylviologen polarographisch als Sauerstoffverbrauch mit Chloroplastenpartikeln gemessen werden. Der Elektronenfluß der 16. Std. des Entwicklungszyklus ist um 46% erniedrigt im Vergleich zu dem der 8. Std. (Abb. 4).

Der△ ATP-Wert der zyklischen Photophosphorylierung und die Elektronenfluß-Kapazität vor PS I zeigen demnach über den Entwicklungszyklus unterschiedlich große Schwankungen. Möglicherweise kann das damit erklärt werden, daß die miteinander verglichenen PS I getriebenen Reaktionen unterschiedliche Bereiche der Elektronentransportkette durchlaufen.

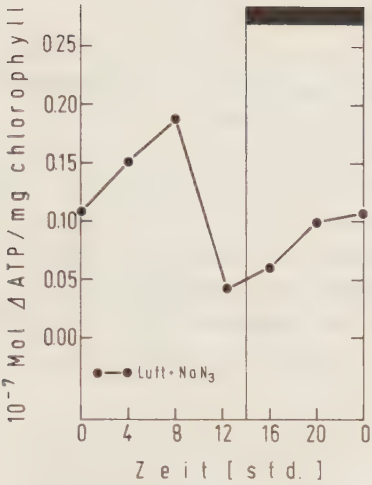

Abb. 25: Änderung der △ ATP-Werte der PS I getriebenen Photophosphorylierung während des Entwicklungszyklus einer Synchronkultur von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe.
Die Zellen wurden im Wechsel von 14 Std. Licht (20.000 Lux) zu 10 Std. Dunkel bei 30°C unter Begasung mit 3 % CO_2 in Luft synchronisiert.
Proben einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die NaN_3 Endkonzentration betrug 5×10^{-3} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen > 620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2 · sec.
Die △ ATP-Werte wurden nach dem in Kap. 5.2.1 beschriebenen Verfahren ermittelt.

Die Elektronen, welche die Photophosphorylierung induzieren, durchlaufen den gesamten zyklischen Elektronentransport-Weg.
Bei der Reaktion von Asc./DCPIP ⟶ MV werden die Elektronen nahe PS I eingeführt und kurz hinter PS I abgefangen.
Die Messungen der PS I-Kapazität geben demnach nur wenig Hinweis darauf, ob der Abfall des △ ATP-Wertes zur 16. Std. durch einen Engpaß in der Elektronentransportkette verursacht wird, oder ob der Abfall Ausdruck einer schlechteren Kopplung von photosynthetischem Elektronentransport und ATP-Bildung ist.

5.2.5.4. Abhängigkeit der Größe des △ ATP-Wertes von der Lichtintensität

Der Vergleich von photosynthetischem Elektronentransport und △ ATP-Wert setzt voraus, daß die Auslenkung des ATP-Pools in den ersten 15 sec nach Belichtung mit der ATP-Bildungsrate vergleichbar ist. Da, wie im folgenden diskutiert werden soll, auch die zyklische Photophosphorylierung eine Lichtintensitätsabhängigkeit zeigt ähnlich der PS I-Reaktionen, erscheint es gerechtfertigt, die Auslenkung des ATP-Pools als quantitativen Parameter einer PS I-getriebenen ATP-Bildungsrate zu werten.
In Abb. 26 ist die Lichtintensitätskurve der △ ATP-Werte der PS I getriebenen Photophosphorylierung dargestellt. Die Photophosphorylierung tritt bereits bei wesentlich geringeren Lichtintensitäten auf als die PS II getriebene Photophosphorylierung und ist bei Lichtintensitäten von ca. 6-8 x 10^{-3} erg/cm ^{2}.sec gesättigt (s.a. zum Vergleich Abb. 21). Die PS I

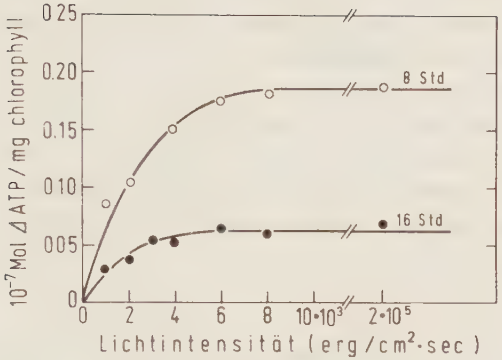

Abb. 26: Abhängigkeit der Größe der △ ATP-Werte der PS I getriebenen Photophosphorylierung von der Lichtintensität in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die NaN_3 Endkonzentration betrug 5×10^{-3} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen >620 nm. Die △ ATP-Werte wurden nach dem in Kap. 5.2.1. beschriebenen Verfahren ermittelt.
Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

getriebene Photophosphorylierung ist demnach wesentlich früher lichtgesättigt, als die PS II ge-
getriebene Photophosphorylierung
Ähnliche Effekte sind an ganzen Algen von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet worden (BEDELL und GOVINDJEE, 1973; KLOB et al., 1971; URBACH und GIMMLER, 1970b).Eine mögliche Ursache für die größere Effektivität von PS I könnte in der primären Energieverteilung gesehen werden, die eine leichte Übertragung von den akzessorischen Pigmenten auf PS I postuliert (BUTLER, 1976).

5.2.5.5. Messung der Photosystem I-getriebenen Photophosphorylierung unter anaeroben Versuchsbedingungen

Anaerobe Versuchsbedingungen wurden im vorliegenden Fall durch Begasung der Algensuspension mit Stickstoff (N_2) bzw. einem Stickstoff — 3% Kohlendioxid-Gemisch (N_2/CO_2) geschaffen. Wie in Kap. 5.2.3. erläutert, wird dadurch der Dunkel-ATP-Pool erniedrigt. Es bestehen jedoch berechtigte Zweifel an der Annahme, daß allein durch Sauerstoff und Kohlendioxid-Entzug der nicht-zyklische Elektronentransport ausgeschaltet werden kann (JESCHKE, 1972; ULLRICH, 1971, s. auch Kap.5.2.1.). Zur Messung der PS I getriebenen Photophosphorylierung wurde deshalb zusätzlich die Wasserspaltung durch DCMU oder NaN_3 blockiert.
In Abb. 27 ist die ATP-Pool-Bestimmung in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii dargestellt. Die Algensuspension ist mit N_2 begast und mit DCMU inkubiert worden.

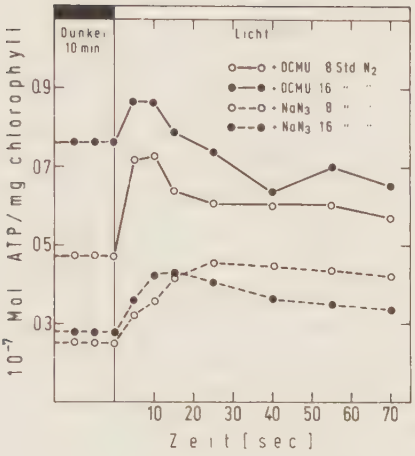

Abb. 27: ATP-Pooländerung der PS I getriebenen Photophosphorylierung beim Dunkel-Licht-Wechsel in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter anaeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit N_2 begast. Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei DCMU 1×10^{-5} M und bei NaN_3 5×10^{-3} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen >620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2·sec. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

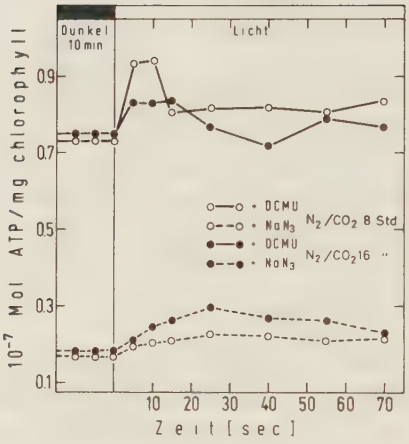

Abb. 28: ATP-Pooländerungen der PS I getriebenen Photophosphorylierung beim Dunkel-Licht-Wechsel in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter anaeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit N_2/CO_2 begast. Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei DCMU 1×10^{-5} M und bei NaN_3 5×10^{-3} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen > 620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2. sec. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

Während unter aeroben Versuchsbedingungen (hoher Dunkel-ATP-Pool) nach DCMU-Zugabe keine nennenswerte ATP-Poolsteigerung bei Belichtung meßbar ist (Abb. 23), kann unter anaeroben Versuchsbedingungen (niedriger Dunkel-ATP-Pool) sehr wohl eine zyklische Photophosphorylierung gemessen werden.
Der $\triangle$ ATP-Wert liegt zur 16. Std. um 65% niedriger als der Vergleichswert zur 8. Std.
Die ATP-verbrauchenden Reaktionen können durch diese Versuchsbedingungen beeinflußt, nicht jedoch gehemmt werden. Der ATP-Pool sinkt (vergl. auch Abb. 13) stark verzögert auf ein niedrigeres Niveau ab. Wie in Abb. 28 dargestellt, wird durch zusätzliche Kohlendioxidbegasung unter sonst gleichen Versuchsbedingungen die Auslenkung des ATP-Pools nicht wesentlich beeinflußt. Zur 8. Std. des Entwicklungszyklus werden etwas niedrigere, zur 16. Std. etwas höhere $\triangle$ ATP-Werte errechnet (Abb. 29), so daß der $\triangle$ ATP-Wert zur 16. Std. nur noch um 57% zum maximalen Wert in der 8. Std. abfällt.
Während dabei die N_2- bzw. N_2/CO_2-Begasung der Algen zur Folge hat, daß die Atmung unterdrückt wird, beeinflußt DCMU die verbrauchenden Reaktionen der Zelle. Dies geschieht u.a. dadurch, daß die NADP-Reduktion und damit die CO_2-Fixierung blockiert ist.
Vergleicht man den Kurvenverlauf des ATP-Pools unter N_2 bzw. N_2/CO_2 (Abb. 13) mit dem unter N_2-Begasung, DCMU-Inkubation bzw. N_2/CO_2-Begasung, DCMU-Inkubation (Abb. 27,28), so findet man die Annahme bestätigt, daß Anaerobiose die Reduktion von NADP durch den linearen Elektronentransport nicht vollständig blockiert. Eine CO_2-Fixierung und damit ein gesteigerter ATP-Verbrauch kann auch noch unter Stickstoffbegasung ablaufen.

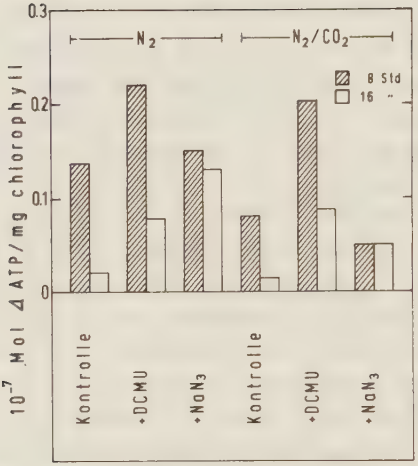

Abb. 29: △ATP-Werte der Photophosphorylierung beim Dunkel-Licht-Wechsel für Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter anaeroben Versuchsbedingungen mit und ohne Hemmstoffzugabe. Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit N_2 bzw. N_2/CO_2 begast. Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei DCMU 1 x 10^{-5} M und bei NaN_3 5 x 10^{-3} M.
Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen >620 nm und einer Intensität von 2 x 10^5 erg/cm^2 · sec. Die △ATP-Werte wurden nach dem in Kap. 5.2.1 beschriebenen Verfahren ermittelt. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

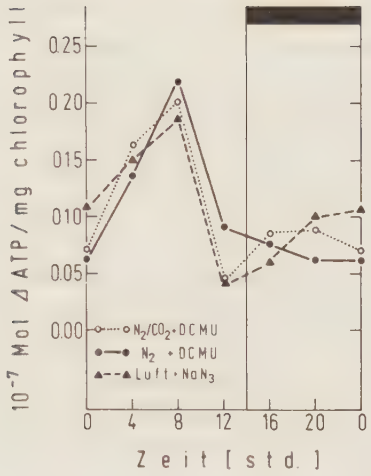

Abb. 30: Änderung der △ ATP-Werte der PS I getriebenen Photophosphorylierung während des Entwicklungszyklus einer Synchronkultur von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben und anaeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe. Die Zellen wurden im Wechsel von 14 Std. Licht (20 000 Lux) zu 10 Std. Dunkel bei 30°C unter Begasung mit 3% CO_2 in Luft synchronisiert.
Proben einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die Hemmstoffkonzentration betrug bei DCMU 1×10^{-5} M und bei NaN_3 5×10^{-3} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen > 620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2. sec. Die △ ATP-Werte wurden nach dem in Kap. 5.2.1. beschriebenen Verfahren ermittelt.

Im weiteren wird die Wirkung von NaN_3 auf N_2 bzw. N_2/CO_2 begaste Algensuspensionen beschrieben. Aus Abb. 15/16 wird deutlich, daß NaN_3 auch unter anaeroben Versuchsbedingungen d.h. unter Sauerstoffmangel die zu erwartende Hemmwirkung auf die Atmung ausübt.
Eine Erklärung, warum zur 8, Std. der Anstieg des ATP-Pools durch eine N_2- bzw. N_2/CO_2- Begasung so stark gehemmt wird und warum zur 16. Std. der Anstieg des ATP-Pools das eine Mal stark forciert (N_2), das andere Mal nicht beeinflußt wird (N_2/CO_2), kann aus den vorliegenden Versuchsanordnungen nicht abgeleitet werden (Abb. 27/ 28). Die in Abb. 29 dargestellten $\triangle$ ATP-Werte der nach NaN_3 Inkubation unter anaeroben Versuchsbedingungen gemessenen PS I getriebenen Photophosphorylierung sollen daher nicht weiter zum Vergleich der Photophosphorylierungskapazitäten untereinander herangezogen werden.

5.2.5.6 Vergleich der unter anaeroben und unter aeroben Versuchsbedingungen gemessenen PS I getriebenen Photophosphorylierung

Im folgenden sollen die unter Luftbegasung / NaN_3-Inkubation (Kap. 5.2.5.1.) und die unter N_2 – Begasung / DCMU- Inkubation bzw. N_2/CO_2-Begasung/ DCMU-Inkubation (Kap. 5.2.5.5.) gemessenen $\triangle$ATP-Werte der PS I getriebenen Photophosphorylierung diskutiert werden. In Abb. 29 sind die unter den oben angeführten Versuchsbedingungen erzielten Werte im Vergleich dargestellt. Es zeigt sich, daß unabhängig von der Sauerstoffkonzentration in der Zelle, die PS I getriebene Photophosphorylierung während des Entwicklungszyklus ein Maximum etwa um die Mitte der Lichtzeit und ein breites Minimum während der Zeit

des Licht-Dunkel-Wechsels hat.
Die absoluten △ ATP-Werte der 8. und 16. Std. des Entwicklungszyklus sind jedoch unter anaeroben Versuchsbedingungen verglichen zu den aeroben Versuchsbedingungen etwas größer.
Es kann demnach unter sehr verschiedenen Versuchsbedingungen eine zyklische Photophosphorylierung gemessen werden, deren △ ATP-Werte nur in geringem Maße voneinander abweichen. Die beschriebenen Versuche lassen den Schluß zu, daß bei erniedrigtem Dunkel-ATP-Pool eine Sauerstoff-unempfindliche zyklische Photophosphorylierung stattfindet, deren △ ATP-Wert als direktes Maß für die Kapazität der Photosystem I getriebenen Photophosphorylierung von Chlamydomonas reinhardii angesehen werden kann. Die Hypothese von AVRON (1966) und HEBER (1969), daß nämlich nur bei Sauerstoffmangel der primäre Akzeptor des zyklischen Elektronentransportes durch Elektronen von PS I reduziert wird, trifft im vorliegenden Fall nicht zu. Es kann daher die von diesen Autoren an Chloroplasten gemachte Beobachtung nicht bestätigt werden, daß in vivo eine Dominanz der pseudozyklischen Photophosphorylierung über die zyklische Photophosphorylierung besteht. Es wurden keine Versuchsergebnisse gewonnen, die zur Interpretation der Annahme von der Existenz einer pseudozyklischen Photophosphorylierung bedurft hätten.

Der Umstand, daß die zyklische Photophosphorylierung unter aeroben Bedingungen bei Grünalgen oft nicht nachweisbar ist, kann möglicherweise dadurch erklärt werden, daß der Dunkel-ATP-Pool nicht genügend abgesenkt wurde. Die Beobachtung, daß die zyklische Photophosphorylierung unter anaeroben Versuchsbedingungen durch DCMU-Zugabe gesteigert werden kann, wurde

bereits für verschiedene Objekte beschrieben (IMAFUKU, 1976; MIGINIAC-MASLOW und MOYSE, 1969; URBACH und GIMMLER, 1970 a,b). Auch die Hemmung der zyklischen Photophosphorylierung durch DCMU ist beschrieben (KAISER und URBACH, 1973). Als Ursache für den höheren $\triangle$ ATP-Wert wird die totale Hemmung einer möglichen NADP-Reduktion durch den nicht-zyklischen Elektronentransport angesehen. Diese Interpretation trifft auch zu für die an Chlamydomonas reinhardii gewonnenen Ergebnisse (vergl. Abb. 13 mit Abb. 27, 28). Nicht erklärt werden können damit jedoch die in Abb. 29 dargestellten erhöhten $\triangle$ ATP-Werte unter Anaerobiose. Nach HUBER und EDWARDS, (1975) stimuliert DCMU ganz prinzipiell die zyklische Photophosphorylierung.
Aus den Versuchen zur PS II getriebenen Photophosphorylierung kann jedoch auch der Hinweis abgeleitet werden, daß N_2-Begasung als solche bereits den $\triangle$ ATP-Wert geringfügig steigert.

Eine zyklische Photophosphorylierung unter anaeroben Versuchsbedinungen nach Hemmung der Wasserspaltung mit DCMU ist beschrieben worden für Synchronkulturen von Scenedesmus obliquus (SCHÄFER, 1975) und Synchronkulturen von Ankistrodesmus braunii (URBACH und GIMMLER, 1970a,b)

Wie für Chlamydomonas reinhardii, so wird auch für Scenedesmus obliquus eine PS I getriebene Photophosphorylierung gemessen, die den Schwankungen der Photosynthesekapazität während des Entwicklungszyklus parallel läuft. Je nach Interpretation der nur geringen Kapazitätsschwankungen der PS I getriebenen Photophosphorylierung kann jedoch auch ein Vergleich gezogen werden zu der mit konstanten Raten über den Entwick-

lungszyklus ablaufenden zyklischen Photophosphorylierung von Ankistrodesmus braunii, einer artverwandten Alge von Scenedesmus obliquus.

5.2.6. Vergleich der unter aeroben Versuchsbedingungen gemessenen △ ATP-Werte der PS II und PS I-getriebenen Photophosphorylierung

Den Messungen der ATP-Pool-Änderungen intakter Zellen von Chlamydomonas reinhardii beim Dunkel-Licht-Wechsel liegt die Annahme zugrunde, daß die Pooländerungen ein quantitatives Maß für die ATP-Bildungsraten der Algen sind. Da es im vorliegenden Fall nicht möglich ist, P/e_2-Quotienten aufzustellen, soll versucht werden, das Verhältnis der absoluten △ ATP-Werte der beiden Energiekonservierungsstellen von Chlamydomonas reinhardii mit dem Verhältnis der P/e_2-Werte der beiden Energiekonservierungsstellen an intakten Chloroplasten zu vergleichen. In Kap. 2.2. wurde beschrieben, daß für die Energiekonservierung der Elektronentransportkette ein P/e_2-Quotient von 1 bestimmt werden konnte, wobei jeder der beiden Energiekonservierungsstellen theoretisch die Hälfte der ATP-Bildungsrate zugeschrieben wird (IZAWA et al., 1974; TREBST, 1974). Während der P/e_2-Quotient der PS I getriebenen Photophosphorylierung einen Wert von 0,5 - 0,6 hat, beträgt der P/e_2-Quotient für die PS II getriebene Photophosphorylierung nur 0,3 - 0,4 (GOULD und IZAWA, 1974). Der Wasserspaltung kommt demnach eine geringere Kopplungseffizienz zu. Daraus kann errechnet werden, daß die PS II getriebene ATP-Bildung nur durchschnittlich 63% des Wertes der PS I getriebenen ATP-Bildung ausmacht.
Ein Vergleich der △ ATP-Werte der beiden nativen Energiekonservierungsstellen von Chlamydomonas reinhardii (s. Abb. 16,22) zeigt, daß die unter aeroben Versuchsbedingungen gemessene PS II-ab-

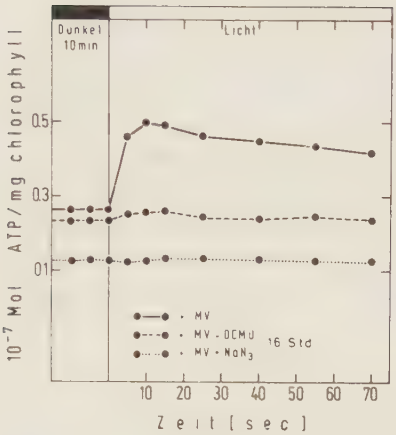

Abb. 31: ATP-Pooländerungen beim Dunkel-Licht-Wechsel in Zellen der 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die Hemmstoffkonzentration betrug bei Methylviologen 2×10^{-3} M, bei DCMU 1×10^{-5} M und bei NaN_3 5×10^{-3} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen >620 nm und einer Intensität von 2×10^{5} erg/cm^2 · sec. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

hängige Photophosphorylierung (mit p-Benzochinon) nur ca. 55% des △ ATP-Wertes erreicht, der für die PS I abhängige Photophosphorylierung (mit NaN_3) gemessen wurde. Die Effizienz der beiden Energiekonservierungsstellen von Chlamydomonas reinhardii ist demnach nicht gleichgroß. Daß die Werte für die Effizienz der Photophosphorylierungskapazität der beiden Photosysteme, die berechnet wurden aus den △ ATP-Werten (bei Chlamydomonas reinhardii) und den P/e_2 Quotienten, (bei Chloroplasten) miteinander vergleichbar sind, ist eine Bestätigung der Behauptung, daß der △ ATP-Wert ein Maß der Photophosphorylierungsrate ist.

5.2.7. Messung der Gesamt-Photophosphorylierung mit Methylviologen als Elektronenakzeptor

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Versuchen wurden bei der Messung der Gesamt-Photophosphorylierung beide Energiekonservierungsstellen (H_2O-Spaltung, Plastochinon) aktiviert, und zwar durch den nicht-zyklischen Elektronentransport. Wie beschrieben (Abb. 12), fällt der ATP-Pool bei Belichtung sofort auf ein niedriges Niveau, wenn die Algensuspension mit Luft begast wurde. Inkubiert man aber die Algen mit Methylviologen, einem für Chloroplasten oft verwendeten Elektronenakzeptor nach PS I, so wird die Reduktion von NADP und damit die CO_2-Fixierung verhindert. Ein zyklischer Elektronentransport kann ebenfalls nicht ablaufen (NEUMANN et al., 1971; STROTMANN und v. GÖSSELN, 1972). Des weiteren wird der Dunkel-ATP-Pool durch den Hemmstoff stark abgesenkt (Abb. 32).
Bei Belichtung steigt dann der ATP-Pool zur 16. Std. des Entwicklungszyklus schnell auf ein hohes Niveau an. Diese ATP-Bildung wird durch DCMU und

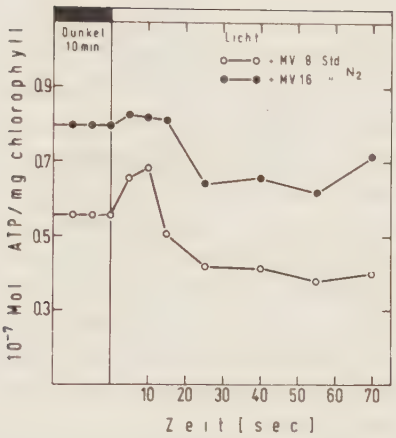

Abb. 32: ATP-Pooländerungen beim Dunkel-Licht-Wechsel in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus gemessen unter anaeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit N_2 begast. Die Methylviologen Endkonzentration betrug 2×10^{-3} M.
Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen > 620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2 . sec. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

NaN_3 gehemmt (Abb. 30). Das ist zum einen ein Beweis dafür, daß die Photophosphorylierung durch einen nicht-zyklischen Elektronentransport zum Methylviologen in Gang gesetzt wurde. Zum anderen ist es, wie bereits erläutert (Kap. 5.2.4.2.) ein Nachweis dafür, daß NaN_3 bzw. der durch diese Substanz aktivierte Hemmstoff kein artifizieller Elektronendonator für die Photosysteme ist. Auf eine Darstellung der unter diesen Versuchsbedingungen gewonnenen Ergebnisse an Zellen der 8. Std. des Entwicklungszyklus wurde verzichtet, weil neben den hohen $\triangle$ ATP-Werten bisweilen auch sehr geringe $\triangle$ATP-Werte gemessen wurden. Eine Abhängigkeit dieser Ergebnisse von der Methylviologen-Konzentration oder dem pH der Algensuspension konnte durch Versuche ausgeschlossen werden. Die Ursache für diese Effekte war nicht abzuklären.

Begast man die mit Methylviologen inkubierten Algen mit Stickstoff, so steigt zur 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus der ATP-Pool kurzfristig an, um dann unter den Dunkel-ATP-Pool abzufallen (Abb. 31). Da die Reduktion von Methylviologen nur durch den nicht-zyklischen Elektronentransport erfolgen kann, muß geschlossen werden, daß auch unter reiner Stickstoffbegasung ein solcher Elektronentransport stattfinden kann.

Der absolute $\triangle$ ATP-Wert der unter aeroben Versuchsbedingungen gemessenen Gesamt-Photophosphorylierung läßt sich aus den jeweiligen $\triangle$ATP-Werten der PS I und PS II getriebenen Photophosphorylierung nicht errechnen. Vielmehr übersteigt der mit Methylviologen gemessene $\triangle$ ATP-Wert den Wert, der aus den Einzelwerten bestimmbar ist. Demzufolge steigert Methylviologen als artifizieller Endakzeptor der Elektronentransportkette die Rate des Elektronentransports in vivo. Ähnliche

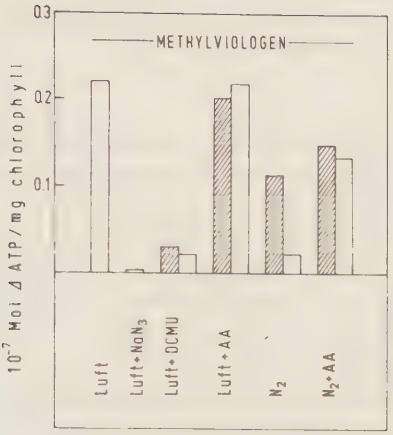

Abb. 33:

△ ATP-Werte der Photophosphorylierung beim Dunkel Licht- Wechsel für Zellen der 8. Std.(schraffiertes Feld) und 16. Std.(helles Feld) des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben und anaeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft bzw. N_2 begast. Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei

AA	1×10^{-4} M
DCMU	1×10^{-5} M
MV	2×10^{-3} M
NaN_3	5×10^{-3} M

Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen > 620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2 sec.
Die △-ATP-Werte wurden nach dem in Kap. 5.2.1 beschriebenen Verfahren ermittelt. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

Beobachtungen sind von BEDELL und GOVINDJEE (1973) an intakten Zellen von Chlorella pyrenoidosa gemacht worden.

5.2.8. Messung der Gesamt-Photophosphorylierung unter anaeroben Versuchsbedingungen

Die Gesamt-Photophosphorylierung kann bei N_2/CO_2-Begasung, d.h. unter Ausschluß von Sauerstoff, gemessen werden. Sowohl nicht-zyklischer als auch zyklischer Elektronentransport können die ATP-Bildung hervorrufen.
Von SLOVACEK und HIND (1976) liegen Untersuchungen zur Sauerstoffentwicklung, d.h. aber auch zum nicht-zyklischen Elektronentransport unter anaeroben Versuchsbedingungen vor. Bei N_2-Begasung und Suspendierung der Chloroplasten in einem Karbonatpuffer wurde eine Lichtsättigungskurve der Sauerstoffentwicklung gemessen. Diese ist im Vergleich zu aeroben Versuchsbedingungen früher gesättigt und erreicht ein niedrigeres Niveau. Das wurde von den Autoren als Hinweis dafür gewertet, daß der nicht-zyklische Elektronentransport durch den zyklischen Elektronentransport behindert wird.
In Abb. 10 sind die ATP-Pool-Messungen für Zellen der 8. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii dargestellt. Das schnelle Absinken des ATP-Pools ist auf die ATP-verbrauchenden Reaktionen in der Zelle zurückzuführen. Zur Diskussion der $\triangle$ATP-Wert-Berechnung sei auf Kap. 5.2.1. verwiesen.
Im folgenden wurde eine Lichtintensitätskurve für die ATP-Pool-Höhe von Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus aufgestellt (Abb. 34), um die Phosphorylierungskapazität der

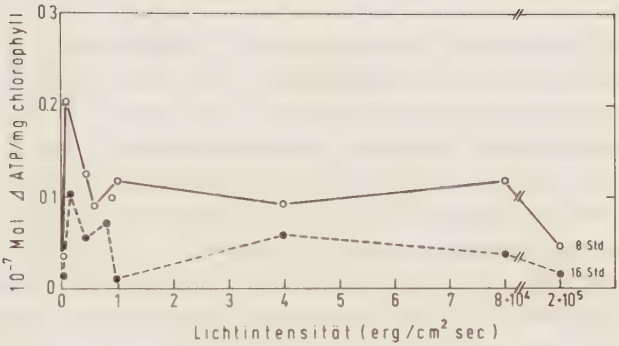

Abb. 34: Abhängigkeit der Größe der △ ATP-Werte der Gesamt-Photophosphorylierung von der Lichtintensität in Zellen der 8.Std. und 16.Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter anaeroben Versuchsbedingungen.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µlPCV/ml Nährlösung wurden mit N_2/CO_2 begast. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen $>$620 nm. Die △ ATP-Werte wurden nach dem in Kap.5.2.1. beschriebenen Verfahren ermittelt. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

gesamten Elektronentransportkette mit derjenigen der einzelnen Photosysteme vergleichen zu können.

Im Bereich sehr geringer Lichtintensitäten sind nach Erniedrigung des Dunkel-ATP-Pools durch anaerobe Versuchsbedingungen sehr hohe $\triangle$ATP-Werte meßbar. Diese ATP-Bildung kann nur durch einen zyklischen Elektronentransport hervorgerufen worden sein, da die Photosystem II-getriebene Photophosphorylierung noch keine Aktivität zeigt (vgl. hierzu Abb. 21/26). Die absoluten $\triangle$ATP-Werte des 1. Maximums sind genauso groß wie die unter N_2/CO_2-Begasung, DCMU-Inkubation gemessenen $\triangle$ATP-Werte der Photosystem I-getriebenen Photophosphorylierung zur 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus. Die Lichtintensität, unter der das Maximum erreicht wird, fällt des weiteren zusammen mit der Sättigung der Lichtintensitätskurve der zyklischen Photophosphorylierung (Abb. 21).

Das 1. Minimum der in Abb. 34 dargestellten Lichtintensitätskurve fällt zusammen mit dem Einsetzen der von PS II getriebenen Photophosphorylierung (Abb. 21). Eine CO_2-Fixierung wird möglich, da der nicht-zyklische Elektronentransport NADP reduziert.

Bei höheren Lichtintensitäten unterliegt die Lichtintensitätskurve starken Schwankungen. Das ist darauf zurückzuführen, daß nicht etwa nur die Photophosphorylierungskapazität, sondern auch die ATP-verbrauchenden Reaktionen (CO_2-Fixierungen) den ATP-Pool beeinflussen. Die Lichtintensitätskurve in Abb. 34 ist deshalb nicht direkt vergleichbar mit denjenigen, die für die PS I und PS II getriebenen Photophosphorylierungskapazität aufgestellt worden sind (Abb.

21/25). Dort war die CO_2-Fixierung durch den Mangel an reduziertem NADP unterdrückt worden.

Aus Abb. 34 kann jedoch einwandfrei geschlossen werden, daß unter anaeroben Versuchsbedingungen, bei niedrigen Lichtintensitäten, vom zyklischen Elektronentransport der maximal erreichbare $\triangle$ ATP-Wert aufgebaut wird. Dies kann als Hinweis dafür dienen, daß die in Kap. 5.2.4 beschriebene Kapazität der zyklischen Photophosphorylierung ein für die Zelle unter physiologischen Bedingungen erreichbarer Wert ist.
URBACH und GIMMLER (1970a,b) schlossen aus ^{32}P Markierungsversuchen, daß die geringe Effektivität von DCMU bei niedrigen Lichtintensitäten, auf einen hohen Anteil der zyklischen Photophosphorylierung an der Gesamt-Phosphorylierung unter diesen Versuchsbedingungen zurückzuführen ist. Ein mit Abb. 34 vergleichbarer Verlauf der Lichtintensitätskurve unter Stickstoffbegasung ist für Scenedesmus obliquus von OKKEH et al. (1975) veröffentlicht worden. Eine mögliche Interpretation ist jedoch nicht erfolgt. MAXWELL und BIGGINS (1976) schlossen aus der geringen turnover-Rate von P_{700}^+ während des zyklischen Elektronentransportes, daß der zyklischen Photophosphorylierung bei hohen Lichtintensitäten keine Bedeutung beim Aufbau eines hohen ATP-Spiegels zukommen kann. Eine Funktion bei niedrigen Lichtintensitäten wird jedoch nicht ausgeschlossen.

5.2.9. Wirkung von Antimycin A auf die ATP-Pool-Änderung

Wie in der Einleitung gezeigt wurde, sind für das Antibiotikum Antimycin A sehr verschiedene Effekte auf Vorgänge in den Chloroplasten be-

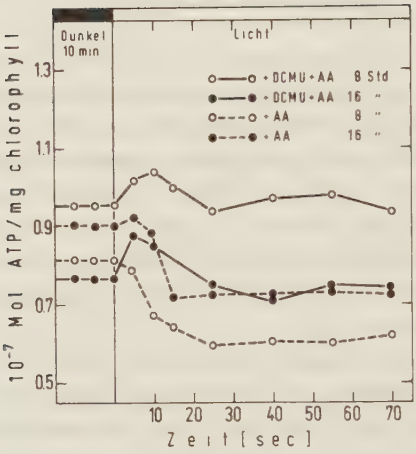

Abb. 35: ATP-Pooländerungen beim Dunkel-Lichtwechsel in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei DCMU 1 x 10^{-5} M und bei Antimycin A 1 x 10^{-4} M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen >620 nm und einer Intensität von 2 x 10^{5} erg/cm^{2}·sec. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

schrieben worden. Zum einen soll Antimycin A am Cyt b_{563} den zyklischen Elektronentransport blockieren, zum anderen wird ein Einfluß auf die CO_2-Fixierungsrate beschrieben.
Aus Abb. 37 wird deutlich, daß die nach Hemmung der Wasserspaltung mit NaN_3 gemessene PS I getriebene Photophosphorylierung von Chlamydomonas reinhardii durch Antimycin A nicht hemmbar ist. Das Antibiotikum zeigt demnach nicht die beschriebene Wirkung auf den zyklischen Elektronentransport. Dies wird durch einen weiteren Versuch bestätigt.
In Abb. 23 war dargestellt worden, daß unter aeroben Versuchsbedingungen nach Hemmung der Wasserspaltung mit DCMU ein Anstieg des ATP-Pools bei Belichtung nicht meßbar ist. Versetzt man nun unter sonst gleichen Versuchsbedinungen die Algen mit Antimycin A, so sinkt der Dunkel-ATP-Pool auf ein niedrigeres Niveau. Bei Belichtung wird dann ein positiver $\triangle$ ATP-Wert meßbar (Abb. 35). Auch aus diesen Versuchen muß gefolgert werden, daß Antimycin A kein spezifischer Hemmstoff des zyklischen Elektronentransports ist. Es ermöglicht vielmehr durch Erniedrigung des Dunkel-ATP-Pools die Messung einer PS I getriebenen Photophosphorylierung.
Es war im folgenden dann die Frage zu klären, welchen Einfluß Antimycin A auf die Photophosphorylierung des nicht-zyklischen Elektronentransports ausübt. Messungen der Photophosphorylierung mit Methylviologen als Elektronenakzeptor zeigen, daß nach Zugabe des Antibiotikums der $\triangle$ ATP-Wert zur 16. Std. des Entwicklungszyklus nur geringfügig erniedrigt wurde. Zur 8. Std. des Entwicklungszyklus ist nach Inkubation mit Methylviologen und Antimycin A

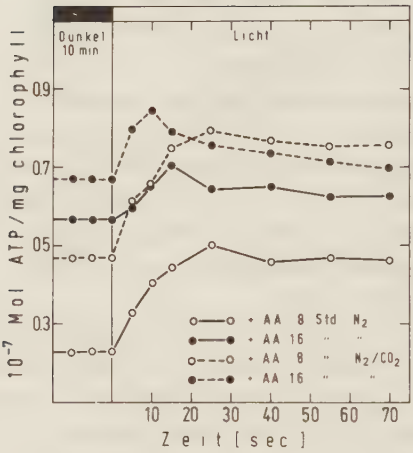

Abb. 36: ATP-Pool-Änderungen beim Dunkel-Licht-Wechsel in Zellen der 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter anaeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe.
Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft begast. Die Antimycin A Endkonzentration betrug 1 x 10^4 M. Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen >620 nm und einer Intensität von 2 x 10^5 erg/cm^2. sec. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb. 4.

ein $\triangle$ ATP-Wert meßbar, der geringfügig niedriger ist als der zur 16. Std. gemessene Wert (Abb. 33). Vergleichswerte für Algen, die nur mit Methylviologen inkubiert wurden, liegen nicht vor. Demgegenüber wird der unter anaeroben Bedingungen nach Inkubation der Algen mit Methylviologen gemessene $\triangle$ ATP-Wert durch Antimycin A-Zugabe gesteigert, so daß zur 8. Std. und 16. Std. des Entwicklungszyklus fast gleich große $\triangle$ ATP-Werte meßbar sind (Abb. 33).
Da eine Wirkung des Antibiotikums auf die Elektronentransportkette ausgeschlossen wurde, war zu klären, ob eine Wirkung auf die ATP-verbrauchenden Reaktionen vorliegt.
Aus Abb. 35 ist zu ersehen, daß nach Erniedrigung des Dunkel-ATP-Pools durch Antimycin A der Abfall des ATP-Pools unter aeroben Versuchsbedingungen stark verzögert abläuft im Vergleich zu nicht mit Hemmstoff inkubierten Algen (Abb. 12). Der negative $\triangle$ ATP-Wert ist im Vergleich zu Abb. 24 erniedrigt.
Begast man die Kulturen mit N_2 oder N_2/CO_2 und inkubiert sie mit Antimycin A, so steigt bei Belichtung der ATP-Pool kontinuierlich an und regelt sich auf ein hohes Niveau ein. Bei Kulturen, die nur mit N_2 bzw. N_2/CO_2 begast wurden (Abb. 13), wird trotz erniedrigtem Dunkel-ATP-Pool bei Belichtung der ATP-Pool nach 5 - 10 sec stark abgesenkt. Der Abfall des ATP-Pools ist damit zu erklären, daß die ATP-Bildung durch den ATP-Verbrauch der Algenzelle übertroffen wird (Kap. 5.2.1.) Folgerichtig sollte dann bei den in Abb. 35 dargestellten Versuchen angenommen werden, daß Antimycin A die ATP-verbrauchenden Reaktionen der Zellen dahingehend beeinflußt, daß ein hoher ATP-Pool aufgebaut wird. Neben der beschriebenen Steigerung der CO_2-Fixierungsrate durch Antimycin

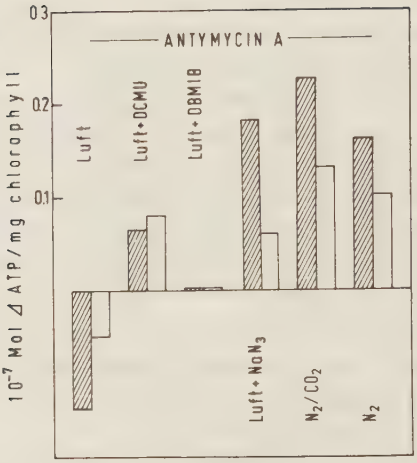

Abb. 37 :

△ ATP-Werte der Photophosphorylierung beim Dunkel-Licht-Wechsel für Zellen der 8. Std. (schraffiertes Feld) und 16. Std. (helles Feld) des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii gemessen unter aeroben und anaeroben Versuchsbedingungen mit Hemmstoffzugabe. Proben mit einer Zelldichte von 2 µl PCV/ml Nährlösung wurden mit Preßluft bzw. N_2 oder N_2/CO_2 begast. Die Hemmstoffendkonzentration betrug bei

AA	1×10^{-4} M
DCMU	1×10^{-5} M
DBMIB	5×10^{-5} M
NaN_3	5×10^{-3} M

Die Belichtung erfolgte mit Wellenlängen >620 nm und einer Intensität von 2×10^5 erg/cm^2 · sec. Die △ ATP-Werte wurden nach dem in Kap. 5.2.1. beschriebenen Verfahren ermittelt. Die Synchronisationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb.4.

A (SCHACTER und BASSHAM, 1972; DRECHSLER et al., 1969; KATOH, 1972) kann somit bei Chlamydomonas reinhardii eine Hemmwirkung des Antibiotikums auf die ATP-verbrauchenden Reaktionen beobachtet werden, so daß bei Belichtung ein hoher ATP-Pool in der Zelle aufgebaut wird.

5.2.10. Messung des ATP-Spiegels während des Entwicklungszyklus

Während des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii wurden kontinuierlich Algenproben aus der Kulturröhre entnommen und anschließend in Perchlorsäure abgetötet und aufgearbeitet. Auf diese Weise sollte der von den Algen in physiologischem Gleichgewicht einregulierte ATP-Spiegel bestimmt werden.

Wie in Abb. 38 dargestellt, sinkt der ATP-Gehalt in den Algen während der Lichtzeit stetig ab und steigt während der Dunkelzeit wieder auf ein hohes Niveau an. Der ATP-Spiegel wird demnach im Gleichgewichtszustand unabhängig von der Kapazität der oxidativen Phosphorylierung und Photophosphorylierung durch die physiologischen Vorgänge in der Zelle auf ein bestimmtes Niveau einreguliert.

Die Austauschbarkeit der ATP-Bildungsstellen wird beim Licht-Dunkel-Wechsel deutlich. Durch drastische Steigerung der oxidativen Phosphorylierung (gemessen als CO_2-Freisetzung s. Abb. 9), wird die Zelle im Dunkeln nicht nur mit ausreichenden Mengen an ATP für physiologische Vorgänge versorgt, sondern kann ihren ATP Spiegel auch noch kontinuierlich steigern. Der nach der 16. Std. inverse Verlauf von ATP-Spiegel und CO_2-Freisetzung durch die Atmung läßt sich wohl damit erklären,

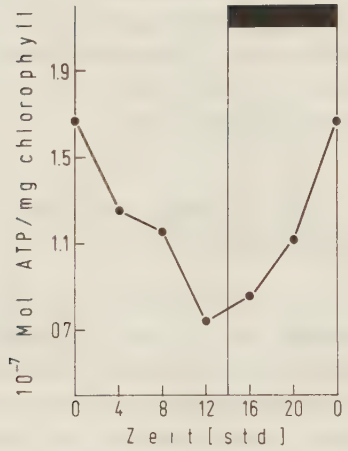

Abb. 38: ATP-Pooländerung in den Zellen von Chlamydomonas reinhardii während des Entwicklungszyklus bei Probenentnahme direkt aus der Kulturröhre.
Die Zellen wurden im Wechsel von 14 Std. Licht (20.000 Lux) zu 10 Std. Dunkel bei 30°C unter Begasung mit 3% CO_2 in Luft synchronisiert.

daß der ATP-Verbrauch der Algen während der Dunkelphase ständig geringer wird. Wesentliche Syntheseschritte der Organismen sind vor der Zellteilung abgeschlossen worden. Trotz Drosselung der Atmung wird genügend ATP gebildet, so daß der ATP-Spiegel kontinuierlich angehoben werden kann.

6. SCHLUßFOLGERUNG

Die Messung der Photophosphorylierung an intakten Zellen von Chlamydomonas reinhardii wird dadurch verkompliziert, daß diese Alge im Dunkeln einen hohen ATP-Pool aufbaut, der bei Belichtung auf einem niedrigeren Niveau einreguliert wird.
Die ATP-Konzentration der Zellen macht dabei 78% der Gesamt-ATP-ADP-Konzentration aus. Positive $\triangle$ ATP-Werte können bei Belichtung jedoch dann gemessen werden, wenn der Dunkel-ATP-Pool experimentell erniedrigt wird. Die teilweise Hemmung der Atmung durch Stickstoffbegasung oder durch Zugabe von Hemmstoffen unter aeroben Versuchsbedingungen ist die Grundvoraussetzung dafür, daß der ATP-Pool sich absenkt und daß bei anschließender Belichtung der Anstieg gemessen werden kann. Die Höhe des Dunkel-ATP-Pools hat unterhalb dieser Grenze jedoch keinen Einfluß auf die Größe des $\triangle$ ATP-Wertes. Unter Beachtung dieser Grundvoraussetzung war es möglich, unter anaeroben wie aeroben Versuchsbedingungen für Chlamydomonas reinhardii die Aktivität von zwei Energiekonservierungsstellen unabhängig voneinander zu untersuchen.
Nach Inkubation mit p-Benzochinon ist eine PS II getriebene Photophosphorylierung meßbar, die DCMU-sensitiv und DBMIB-insensitiv ist. Die Größe der $\triangle$ ATP-Werte ist gekoppelt mit den Änderungen der als Hill-Reaktion gemessenen Änderung der PS II-Aktivität über den Entwicklungszyklus. Die Kopplungseffizienz dieser Energiekonservierungsstelle ist als gering zu bezeichnen, da der absolute $\triangle$ ATP-Wert nur 55% des Wertes ausmacht, der für die PS I-getriebene Photophosphorylierung gemessen wurde. Aus den Versuchen kann geschlossen werden, daß Plastochinon nicht beteiligt ist bei der

Ausbildung des △ ATP-Wertes. Es muß vielmehr angenommen werden, daß die mit der PS II-Aktivität gekoppelte Energiekonservierung durch die photosynthetische Wasserspaltung hervorgerufen wird. Des weiteren war es möglich, unter aeroben Versuchsbedingungen eine PS I getriebene Photophosphorylierung zu messen, die mit dem zyklischen Elektronentransport gekoppelt ist. Die Änderungen der △ ATP-Werte über den Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii haben prinzipiell den gleichen Verlauf wie die PS I-Aktivität. Die Differenz zwischen dem maximalen (8.Std) und minimalen (16.Std) △ ATP-Wert ist jedoch größer als es aus den Messungen der PS I-Aktivität mit Asc./DCPIP MV sich ergab. Dieser Unterschied mag darauf beruhen, daß im einen Fall ganze Zellen, im anderen Fall Chloroplastenpartikel untersucht wurden.
Die PS I getriebene Photophosphorylierung ist DCMU-insensitiv und DBMIB-sensitiv. Zur Hemmung des zyklischen Elektronentransports wird jedoch eine höhere DBMIB-Konzentration benötigt als zur Hemmung des nicht-zyklischen Elektronentransports. Dies wird von SUNDBERG et al. (1976) dahingehend interpretiert, daß vom nicht-zyklischen Elektronentransport andere Teile des Plastochinonpools reduziert werden als durch den zyklischen Elektronentransport. Plastochinon baut den für die ATP-Bildung der PS I getriebenen Photophosphorylierung erforderlichen Protonengradienten auf. Es ist als Energiekonservierungsstelle sowohl des zyklischen Elektronentransportes als auch des nicht-zyklischen Elektronentransports vom Wasser zu NADP anzusehen.

Der genaue Angriffspunkt von NaN_3 als Hemmstoff der Wasserspaltung ist nicht weiter untersucht worden. Es kann jedoch ausgeschlossen werden,

daß die nach Inkubation mit NaN_3 gemessene Photophosphorylierung dadurch induziert wurde, daß Superoxid in der Zelle angereichert wurde, welches dann Elektronen in PS II einfüttert und einen mit der ATP-Synthese gekoppelten Elektronentransport in Gang setzt. Messungen der PS I getriebenen Photophosphorylierung wurden auch unter anaeroben Versuchsbedingungen nach Hemmung der Wasserspaltung mit DCMU vorgenommen. Die absoluten $\triangle$ ATP-Werte unter N_2- bzw. N_2/CO_2-Begasung liegen geringfügig über den $\triangle$ATP-Werten, die unter aeroben Versuchsbedingungen gewonnen wurden. Da auch der $\triangle$ ATP-Wert der PS II getriebenen Photophosphorylierung durch Stickstoffbegasung geringfügig gesteigert wurde, ist anzunehmen, daß Anaerobiose die $\triangle$ ATP-Werte steigert. Die unter Anaerobiose gemessenen $\triangle$ ATP-Werte der PS I-getriebenen Photophosphorylierung zeigen dieselben Änderungen während des Entwicklungszyklus wie die unter aeroben Versuchsbedingungen gemessenen $\triangle$ATP-Werte. Aus den Versuchen ist zu ersehen, daß keine prinzipielle Sauerstoffempfindlichkeit für die zyklische Photophosphorylierung besteht. Es kann vielmehr gezeigt werden, daß unter anaeroben und aeroben Versuchsbedingungen eine fast gleich hohe ATP-Bildungsrate meßbar ist, vorausgesetzt, der Dunkel-ATP-Pool wurde durch geeignete Methoden erniedrigt.

Die frühe Lichtsättigung der PS I getriebenen Photophosphorylierung ist ein häufig beobachtetes Phänomen (URBACH und GIMMLER, 1970; BEDELL und GOVINDJEE, 1973; KLOB et al., 1971). Die Lichtsättigung der PS I getriebenen Photophosphorylierung wird bei Chlamydomonas reinhardii bei Intensitäten erreicht, die um eine Zehner-

potenz niedriger liegen als diejenigen, welche zur Sättigung der PS II-getriebenen Photophosphorylierung erforderlich sind. Die Lichtsättigung sowohl der Photosynthese und der CO_2-Fixierung, als auch der Aktivität von PS I und PS II liegt im Bereich von 6 - 8 x 10^4 erg/cm^2. sec und ist damit vergleichbar mit den Werten für die PS II getriebene Photophosphorylierung. Untersuchungen mit N_2/CO_2-Begasung der Algen zeigen, daß bei erniedrigtem Dunkel-ATP-Pool der frühen Lichtsättigung der zyklischen Photophosphorylierung eine physiologische Bedeutung zukommt. Dann nämlich, wenn ein nicht-zyklischer Elektronentransport noch nicht meßbar ist, kommt der PS I getriebenen Photophosphorylierung die Funktion zu, den ATP-Pool bei Belichtung aufzufüllen.
Welche Bedeutung die PS I getriebene Photophosphorylierung bei hohen Lichtintensitäten hat, ist aus den Versuchen nicht abzuleiten. Es wird durch die Versuche jedoch eindeutig nachgewiesen, daß eine generelle Sauerstoffempfindlichkeit des zyklischen Elektronentransportes nicht vorliegt. Die Hypothese, daß erst bei Sauerstoffmangel der primäre Akzeptor des zyklischen Elektronentransports durch Elektronen von PS I reduziert werden kann, trifft für Chlamydomonas reinhardii nicht zu. Vielmehr wurden keine Versuchsergebnisse gewonnen, die zu ihrer Interpretation der Annahme der Existenz einer pseudozyklischen Photophosphorylierung bedurft hätten.

7. ZUSAMMENFASSUNG

1. Synchronkulturen von Chlamydomonas reinhardii zeigen im Verlauf des Entwicklungszyklus Schwankungen der Aktivität von PS II und PS I, die den Änderungen der Photosynthesekapazität parallel laufen. Die Lichtsättigung dieser Reaktionen wird bei fast der gleichen Intensität erreicht.

2. Die CO_2-Fixierungskapazität folgt im lichtsättigenden Bereich den Aktivitätsschwankungen der Kapazität der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung über den Zyklus. Der Sättigungswert der Lichtintensität ist identisch mit dem der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung. Die Atmungskapazität, gemessen als CO_2-Freisetzung ist demgegenüber zur Dunkelzeit sehr hoch und sinkt während der Lichtzeit des Entwicklungszyklus stetig ab.

3. Chlamydomonas reinhardii baut im Dunkeln einen hohen ATP-Pool auf, der bei Belichtung auf ein niedrigeres Niveau abfällt. Die ADP-Konzentration in der Zelle beträgt im Dunkeln nur 21 % vom Gesamt-ADP+ATP-Pool und steigt bei Belichtung auf 37 % an. Simultane Messungen der ATP und ADP-Konzentration an Chlamydomonas reinhardii zeigen, daß sich der ADP-Pool beim Dunkel-Licht-Wechsel invers verhält zu den Änderungen des ATP-Pools.

4. Nach Erniedrigung des Dunkel-ATP-Pools der Algen durch Hemmstoffzugabe oder Stickstoffbegasung war es möglich, die beiden Energiekonservierungsstellen der photosynthetischen Elektronentransportkette von Chlamydomonas reinhardii unabhängig voneinander zu untersuchen.

5. Die PS II getriebene Photophosphorylierung wurde mit p-Benzochinon als Elektronenakzeptor gemessen. Sie verläuft parallel den Änderungen der als Sauerstoffproduktion gemessenen Aktivitätsschwankungen von PS II während des Entwicklungszyklus. Die PS II getriebene Photophosphorylierung ist DCMU sensitiv und DBMIB insensitiv. Der $\triangle$ATP-Wert wird durch Stickstoffbegasung gesteigert.

6. Die PS I getriebene Photophosphorylierung, die durch einen zyklischen Elektronentransport ausgelöst wird, kann unter aeroben Versuchsbedingungen (Luftbegasung, NaN_3-Inkubation) und unter anaeroben Versuchsbedingungen (Stickstoffbegasung, DCMU-Inkubation) nach Erniedrigung des Dunkel-ATP-Pools und Hemmung der Wasserspaltung gemessen werden. Sie ist DCMU insensitiv und DBMIB sensitiv. Zur Hemmung des zyklischen Elektronentransports sind jedoch höhere DBMIB-Konzentrationen erforderlich als zur Hemmung des nicht-zyklischen Elektronentransportes. Die $\triangle$ATP-Werte der unter Stickstoffbegasung gemessenen PS I getriebenen Photophosphorylierung sind leicht erhöht im Vergleich zu den unter Luftbegasung gemessenen Werten. Die $\triangle$ATP-Werte zeigen während des Entwicklungszyklus von Chlamydomonas reinhardii die gleichen Schwankungen in der Kapazität wie die PS I-Aktivität gemessen mit Ascorbat / DCPIP $\longrightarrow$ MV. Es treten jedoch größere Diskrepanzen auf zwischen dem maximalen Wert zur 8. Std. und dem minimalen Wert zur 16. Std. des Entwicklungszyklus.

7. Aus den Hemmstoffversuchen wird geschlossen, daß die Energiekonservierung der PS II getriebenen Photophosphorylierung mit der photosynthetischen Wasserspaltung gekoppelt ist, während die Energiekonservierung der PS I getriebenen Photophosphorylierung mit der Reoxidation von Plastochinon gekoppelt ist. Der mit der Wasserspaltung gekoppelten Energiekonservierung ist unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine geringere Kopplungseffizienz zuzuschreiben.

8. Die PS I getriebene Photophosphorylierung ist bei Lichtintensitäten gesättigt, die um eine Zehnerpotenz niedriger liegen als die, welche zur Lichtsättigung der PS II getriebenen Photophosphorylierung erforderlich sind. Messungen der Photophosphorylierung unter N_2 / CO_2-Begasung zeigen, daß bei erniedrigtem Dunkel-ATP-Pool bei solchen Lichtintensitäten, bei denen die nicht-zyklische Photophosphorylierung erst in geringen Raten abläuft, der zyklischen Photophosphorylierung die Funktion zukommt, den ATP-Pool der Zellen aufzufüllen.

9. Antimycin A, welches den zyklischen Elektronentransport bei Cyt b_{563} blockieren soll, zeigt keine Wirkung auf den Elektronentransport von Chlamydomonas reinhardii. Es beeinflußt jedoch die ATP-verbrauchenden Reaktionen der Zelle.

8. Literatur

AMESZ,J.; PULLES,M.P.; VISSER,V.W. and SIBBING,F.A. (1972)
Reactions of b-cytochromes in the red alga Porphyridium aerugineum.
Biochim. Biophys. Acta 272, 442-452.

ARNON,D.J.; TSUJIMOTO,H.J. and Mc SWAIN,B.C. (1967):
Role of ferredoxin in photosynthetic production of oxygen I. Photophosphorylation by chloroplasts.
Nature 214, 562-566.

ARNON,D.J. (1969):
Role of ferredoxin in photosynthesis.
Naturwissenschaften 56, 295-305.

AUSLÄNDER,W. and JUNGE,W. (1975):
Neutral red, a rapide indicator for pH-changes in the inner phase of thylakoids.
FEBS LETT. 59, 310-315

AVRON,M. (1963):
A coupling factor in photophosphorylation.
Biochim. Biophys. Acta 77, 699-702.

Avron,M. and Chance,B. (1966):
Relation of photophosphorylation to electron transport in isolated chloroplasts.
In: Energy conservation by the photosynthetic apparatus, Brookhaven Symposium Biol. 19, 149-160.

AVRON,M. and NEUMANN,J. (1968):
Photophosphorylation in chloroplasts.
Ann. Rev. Plant Physiol. 19,137-166.

BALTSCHEFFSKY,H.; BALTSCHEFFSKY,M. and THORNE,M. (1971):
Energy conservation reactions in bacterial photosynthesis.
Current topics of Bioenergetics 4,273-325.

BAMBERGER,E.S. and AVRON,M.(1975):

CO_2-fixation in the light and in the dark by isolated spinach chloroplasts.

Plant Physiol. 56,481-485.

BARBER,J.(1968):

Light induced uptake of potassium and chloride by Chlorella pyrenoidosa.

Nature 217,876-978.

BEDELL,G.W. and GOVINDJEE(1973):

Photophosphorylation in intact algae: Effects of inhibitors, intensity of light, electron acceptors and donors.

Plant & Cell Physiol. 14,1081-1097.

BERDEN,I.A. and SLATER,E.C.(1972):

The allosteric binding of antimycin A to cytochrome b in the mitochondrial membrane.

Biochim.Biophys.Acta 256,199-215.

BERZBORN,R.J. and BISHOP,N.I.(1973):

Isolation and properties of chloroplast particles of Scenedesmus obliquus D_3 with high photochemical activity.

Biochim.Biophys.Acta 292,700-714.

BIGGINS,J.(1974):

The role of plastoquinone in the in vivo photosynthetic cyclic electron transport pathway in algae.

FEBS LETT. 38,311-314.

BISHOP,N.I.(1958):

The influence of the herbicide DCMU on the oxygen- evolving system of photosynthesis. Biochim.Biophys.Acta 27,205-206.

BISHOP,N.I. and SENGER,H.(1971):

Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of Scenedesmus obliquus. In: Methods in Enzymology XXIII, Photosynthesis, A. San Pietro ed., Academic Press, New York, 1971,53-66.

BÖHME,H. and TREBST,A.(1969):

On the properties of ascorbate photooxidation in isolated chloroplasts. Evidence for two ATP sites in noncyclic photophosphorylation. Biochim.Biophys.Acta 180,137-148.

BÖHME,H. and CRAMER,W.A.(1971):

Plastoquinone mediated electron transport between cytochrome b559 and cytochrome f in spinach chloroplasts.
FEBS LETT. 15,349.

BÖHME,H.,REIMER,S. and TREBST,A.(1971):

The effect of dibromothymoquinone, an antagonist of plastoquinone, on noncyclic electron flow systems in isolated chloroplasts. Z. Naturforsch. 26b,341-351.

BÖHME,H. and CRAMER,W.A.(1972):

The role of cytochrome b_6 in cyclic electron transport: Evidence for an energy-coupling site in the pathway of cytochrome b_6 oxidation in spinach chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 282, 302-305.

BORNEFELD,T.; DOMANSKI, W. and SIMONIS, W. (1972):
Influence of light conditions, gassing and inhibitors on photophosphorylation and the ATP-level in Anacystis nidulans.
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1972, 1379-1386.

Bornefeld,T. and Simonis,W. (1974a):
Effects of light, temperature, pH and inhibitors on the ATP-level of the blue-green alga Anacystis nidulans.
Planta 115, 309-318.

BOTHE,H. (1969):
Ferredoxin als Cofaktor der zyklischen Photophosphorylierung in einem zellfreien System aus der Blaualge Anacystis nidulans.
Z. Naturforschung 24b, 1574-1582.

BOYER,P.D. (1975):
A model for conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP-synthesis and to active transport.
FEBS LETT. 58, 1-6.

BOYER,P.D.; CHANCE,B.; ERNSTER,L.; MITCHELL,P.; RACKER,E. and SLATER,E.C. (1977):
Oxidative phosphorylation and photophosphorylation.
Ann. Rev. Biochem. 46, 955-1026.

BRADEEN,D.A. and WINGET, G.D. (1974):
Site specific inhibition of photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts by $HgCl_2$ II. Evidence for three sites of energy conservation associated with non-cyclic electron transport.
Biochim. Biophys. Acta 333, 331-342.

BRAND,J.J.; CURTIS,V.A.; TOGUSAK,P.K. and SAN PIETRO,A. (1975):
Partial reactions of photosynthesis in briefly sonicated Chlamydomonas reinhardii II. Photophosphorylation activities.
Plant Physiol. 55, 187-191.

BURR (1966):
Thesis Rockefeller University New York

BUTLER,W.L. (1976):
Energy distribution in the photosynthetic apparatus of plants.
Reprinted from: Chlorophyll-proteins, reaction centers and photosynthetic membranes, Brookhaven Symposia in Biology 28,338-346.

CHEER,I. (1974):
Improved methods for ATP analysis.
Analyt. Biochem. 60, 102-114.

COHEN,D.E.; COHEN,W.S. and BERTSCH,W. (1975):
Inhibition of photosystem II by uncouplers at alkaline pH and its reversal by artificial electron donors.
Biochim. Biophys. Acta 376, 97-104.

CURTIS,V.A.; BRAND,J.J and TOGASAHI,R.K. (1975):
Partial reactions of photosynthesis in briefly sonicated Chlamydomonas reinhardii I. Cell breakage and electron transport activities.
Plant Physiol. 55, 183-186.

DINER,B. and MAUZERALL,D. (1973):

Feedback controlling oxygen production in a cross-reaction between two photosystems in photosynthesis.

Biochim. Biophys. Acta 305, 329-352.

DINER,B. and MAUZERALL,D. (1973):

The turnover times of photosynthesis and redox properties of the pool of electron carriers between the photosystems.

Biochim. Biophys. Acta 305, 353- 363.

DINER,B. (1974):

Dependence of the turnover and deactivation reactions of photosystem II on the redox state of the pool A varied under anaerobic conditions.

Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 3rd 1974, 589-601.

DRECHSLER,Z.,NELSON,N. and NEUMANN,J.(1969):

Antimycin A as an uncoupler and electron transport inhibitor in photoreactions of chloroplasts.

Biochim.Biophys.Acta 189,65-73.

EGNEUS,H.,HEBER,U.,MATTHIESEN,W. and KIRK,M.(1975):

Reduction of oxygen by the electron transportchain of chloroplasts during assimilation of carbon dioxide.

Biochim.Biophys.Acta 408,252-268.

ESTABROOK,R.W.(1967):

Mitochondrial respiratory-control and the polarographic measurement of ADP: O_2ratios.

In: Methods in Enzymology X, Oxidation and Phosphorylation, Colowick, S.P. and Kaplan,N.O. eds., Acad. Press New York, 41-47.

FORK,D.C.(1972):
Oxygen electrode
In: Methods in Enzymology XXIV, Photosynthesis and Nitrogen Fixation Part B, A. San Pietro ed., Acad. Press, New York, 113-123.

FORTI,G. and ROSA,L.(1971):
On the pathway of electron transport in cyclic photophosphorylation.
FEBS LETT. 18,55-58.

FORTI,G. and ROSA,L.(1972):
Cyclic photophosphorylation.
In: Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1972,1261-1270.

FORTI,G. and GEROLA,P.(1977):
Inhibition of photosynthesis by azide and cyanide and the role of oxygen in photosynthesis.
Plant Physiol. 59,859-862.

FRICKEL-FAULSTICH,B.(1974):
Veränderungen im photosynthetischen Elektronentransport einzelliger Grünalgen während des Entwicklungszyclus.
Dissertation, Marburg.

GAENSELER,R. and Mc CARTY,R.E.(1971):
Amine uptake in chloroplasts.
Arch. Biochem. Biophys. 147,55-65.

GALSTON,A.W.(1955):
Plant catalase
In: Methods in Enzymology II, Colowick,S.P. and Kaplan,N.O. eds., Acad. Press New York, 789-791.

GIAQUINTA,R.T., ORT,D.R. and DILLEY,R.A.(1975):
The possible relationship between a membrane conformational change and photosystem II dependent hydrogen ion accumulation and adenosin-5-triphosphate synthesis.
Biochemistry 14,4392-4396.

GIMMLER,H.(1973):
Correlation between photophosphorylation and light induced conformational changes of chloroplasts in whole cells of halophilic green alga Dunaliella parva.
Z. Pflanzenphysiol. 68, 289-307.

GIMMLER,H.(1977):
Photophosphorylation in vivo.
In: Enzyclopaedia of Plant Physiol., New Series Vol. V, Photosynthesis I, Trebst,A. and Avron,M. eds., Springer-Verlag Berlin, 448-472.

GOULD,J.M. and IZAWA,S.(1973):
Studies on the energy coupling sites of photophosphorylation. 1) Separation of site I and site II by partial reactions of the chloroplast electron transport chain.
Biochim.Biophys.Acta 314,211-223.

GOULD,J.M. and IZAWA,S.(1973):
PS-II electron transport and phosphorylation with DBMIB as electron acceptor.
Europ. J. Biochem. 37, 185-192.

GOULD,J.M. and IZAWA,S. (1974):
Studies on the energy coupling sites of photophosphorylation IV: The relation of proton fluxes to the electron transport and ATP formation associated with PS II.
Biochim. Biophys. Acta 333, 509-524.

GRÄBER,P. and WITT,H.-T. (1974):
On the extent of the electrical potential across the thylakoid membrane induced by continuous light in Chlorella cells.
Biochim. Biophys. Acta 333, 389-392.

GRÄBER,P. and WITT,H.-T. (1975):
Direct measurement of the protons pumped into the inner phase of the functional membrane of photosynthesis per electron transport.
FEBS LETT. 59, 184-189.

GRÄBER,P. and WITT,H.-T. (1976):
Relations between the electrical potential, pH-gradient, protonflux and phosphorylation in the photosynthetic membrane.
Biochim. Biophys. Acta 423, 141-163.

GARNIER,J. and MAROC,J. (1972):
Studies on the electron transport chain of three non-photosynthetic mutants of Chlamydomonas reinhardii.
Proc.Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1972, 669-675.

GRUBER,W.; MÖLLERING,H. und BERGMEYER,H.-U. (1970):
Analytische Differenzierung von Purin- und Pyrimidin-Nukleotiden. Bestimmung von ADP, ATP sowie die Summe GTP+ITP in biologischem Material.
In: Methoden der Enzymat. Analyse, Bergmeyer,H.-U. ed., Verlag Chemie Weinheim,2010-2019 Bd II.

HALL,D.O.(1976):
The coupling of photophosphorylation to electron transport in isolated chloroplasts.
In: Topics in Photosynthesis, Vol. I, The intact Chloroplast, J.Barber ed., Elsevier Sci. Publ. Comp. Amsterdam, 135-170.

HAMLIN,L.; TILLBERG,J.E. and SUNDBERG,I. (1975):
Effects of azide on photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts.
Physiol. Plant. 34, 296-299.

HARRIS,D.A. and SLAYTER,E.C. (1975):
Tightly bound nucleotides of the energy-transducing ATPase of chloroplasts and their role in photophosphorylation.
Biochim. Biophys. Acta 387, 335-348.

HARTH,E.; OETTMEIER,W. and TREBST,A. (1974):
Native and artificial energy-conserving sites operating in coupled electron-donor systems for photosystem II.
FEBS LETT. 43,231-234.

HAUSKA,G.; REIMER,S. and TREBST,A. (1974):
Native and artificial energy-conserving sites in cyclic photophosphorylation systems.
Biochim. Biophys. Acta 357, 1-13.

HAUSKA,G.; OETTMEIER,W.; REIMER,S. and TREBST,A. (1975):
Shuttles of artificial electron donors for photosystem I across the thylakoid membrane.
Z. Naturforsch. 30, 37-45.

HAUSKA,G. and TREBST,A. (1977):
Proton translocation in chloroplasts.
In: Current Topics in Bioenergetics, D.R. Sanadi ed., Acad. Press New York, Vol. VI, 152-210.

HEATHCOTE,P. and HALL,D.O. (1974):
Non-cyclic photophosphorylation in photosystem II and photosystem I. Stoichiometry and photosynthetic control.
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 3rd, 1974, 463-472

HEBER,U. (1969):
Conformational changes of chloroplasts induced by illumination of leaves in vivo.
Biochim. Biophys. Acta 18o, 302-319.

HEBER,U. (1973):
Elektronentransport zum Sauerstoff und ATP-Verbrauch in der Photosynthese.
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 86,187-195.

HEBER,U. and SANTARIUS, K.A. (1970):
Direct and indirect transfer of ATP and ADP across the chloroplast envelope.
Z. Naturforsch. 25b, 718-728.

HEBER,U.; BOARDMAN,N.K. and ANDERSON,J.M. (1976):
Cytochrome b-559 redox changes in intact CO_2-fixing spinach chloroplasts and in developing pea chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 423, 275-292.

HELDT,H.W. (1976):
Metabolite transport in intact spinach chloroplasts.
In: Topics in Photosynthesis, Vol. I, The intact Chloroplast, J.Barber ed., Elsevier Sci. Publ. Comp. Amsterdam, 215-234.

HELDT,H.W.; WERDAN,K. and MILOVANCEV,M.(1973):
Alkalisation of the chloroplast stroma caused by light dependent protonflux into the thylakoid space.
Biochim. Biophys. Acta 314, 224-241.

HESSE,M.; KULANDAIVELU,G. and BÖGER,P.(1977):
Characterisation of synchronized cultures of Bumilleriopsis filiformis.
Arch. Microbiol. 112,141-145.

HIND,G. (1968):
Light induced changes in cytochrome b_{559} in spinach chloroplasts.
Photochem. Photobiol. 7,369-375.

HIND,G.; MILLS,J.D. and SLOVACEK,R.E. (1977):
Cyclic electron transport in photosynthesis.
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 4th, 1977,591-600.

HIYAMA,T.; NISHIMURA,M. and CHANCE,B. (1970):
Energy and electron transfer systems of Chlamydomonas reinhardii II. Two cyclic pathways of photosynthetic electron transfer in a pale green mutant.
Plant Physiol. 46, 163-168.

HOLDEN,M. (1965):
Chlorophylls.
In: Chemistry and biochemistry of plant pigments, Goodwin,T.W. ed., Acad. Press London, 461-488.

HUBER,ST.C. and EDWARDS,G.E. (1975):
Effect of DBMIB,DCMU and Antimycin A on cyclic and noncyclic electron flow in C_4 mesophyll chloroplasts.
FEBS LETT. 58, 211-214.

IMAFUKU,H. (1976):
Anaerobic ATP-levels in the blue-green alga Anabaena. Dark light transients and effects of light intensity.
Physiol. Plant. 38,191-195.

INOUE,H. and NISHIMURA,M. (1971):
Electron flow from hydrogen peroxide in photosystem II catalyzed oxidation reduction reactions of spinach chloroplast fragments.
Plant & Cell Physiol. 12, 739-747.

IZAWA,S.; CONNELLY,T.N.; NINGET,G.D. and GOOD,N.E. (1966):
Inhibition and uncoupling of phosphorylation in chloroplasts.
In: Energy conversion by the photosynthetic apparatus, Brookhaven Symposium Biol. 19, 169-187.

IZAWA,S.; GOULD,J.M.; FELKER,D.R. and GOOD,N.E. (1973):
Electrontransport and photophosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor III. A DBMIB-insensitive phosphorylation reaction associated with PS II.
Biochim. Biophys. Acta 305,119-128.

IZAWA,S.; ORT,D.R.; GOULD,J.M. and GOOD,N.E. (1974):
Electron transport reactions, energy conservation reactions and phosphorylation in chloroplasts.
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 3rd,1974, 448-461.

JAGENDORF,A.T. and HIND,G. (1963):
Photosynthetic mechanisms in green plants.
Nat. Acad. Sci. U.S.A. Publ. 1145, 599-610.

JAGENDORF,A.T. and URIBE,E. (1966):
ATP-formation caused by acid-base transition on spinach chloroplasts.
Proc. Nat. Acad. Sci. 55, 170-177.

JAGENDORF,A.T. (1975):
Mechanism of photophosphorylation.
In: Bioenergetics of photosynthesis, Govindjee ed., Acad. Press New York, 413-492.

JENNINGS,R.C. (1974):
Involvement of oxygen during photosynthetic induction.
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 3rd, 1974, 735-743.

JESCHKE,W.B. und SIMONIS,W. (1969):

Über die Wirkung von CO_2 auf die lichtabhängige Cl^--Aufnahme bei Elodea densa: Regulation zwischen nicht-zyklischer und zyklischer Photophosphorylierung.

Planta 88, 157-171.

JESCHKE,W.B. (1972):

Über den lichtgeförderten Influx von Ionen in Blättern von Elodea densa. Vergleich der Influxe von K^+- und Cl^--Ionen.

Planta 103, 164-180

JONES,P.C.T. (1970):

The effect of light, temperature and anaesthetics on ATP-level in the leaves of Chenopodium rubrum and Phaseolus vulgaris.

J.exp. Bot. 21,58-63.

JUNGE,W.(1977):

Membrane potentials in photosynthesis.

Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 503-536.

KAISER,W. und URBACH,W. (1973):

Endogene zyklische Photophosphorylierung in isolierten Chloroplasten.

Ber. Dtsch. Bot. Ges. 86,213-216.

KANDLER,O. und TANNER,W. (1966):

Die Photoassimilation von Glucose als Indikator für die Lichtphosphorylierung in vivo.

Ber. Dtsch. Bot. Ges. 79,48-57.

KATOH,S. (1972):
Inhibitors of electrontransport associated with photosystem II in chloroplasts.
Plant & Cell Physiol. 13, 273-286.

KLOB,W.; KANDLER,O. and TANNER,W. (1973):
The role of cyclic photophosphorylation in vivo.
Plant Physiol. 51,825-827.

KRAUSE,G.H. and HEBER,U. (1971):
Reaction of oxygen with the electron transport chain of photosynthesis.
Proc. 1st Eur. Biophys. Congr. 79-91.

KRAUSE,H.P. (1973):
Untersuchungen über die Bedeutung von Atmung und Glykolyse für Zellvermehrung und Energiestoffwechsel von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Dissertation, Marburg

KRAUSE,G.H. and HEBER,U. (1976):
Energetics of intact chloroplasts.
In: Topics in Photosynthesis, Vol.I, The intact Chloroplast, Barber,J. ed., Elsevier Sci. Publ. Comp. Amsterdam, 171-214.

KUHL,A. and LORENZEN,H. (1964):
Handling and culturing of Chlorella.
In: Methods in Cell Physiology, Vol.I, Prescott, D.M. ed., Acad.Press New York, 159-187.

KYLIN,A.; OKKEH,A.; SUNDBERG,I. and TILLBERG,J.E. (1974):
Number of photophosphorylation sites, regulation of their activity and differences in their performances.
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 3rd, 1974, 1047-1054.

LARKUM,A.W.D. and BONNER,W.D. (1972):
Light induced absorbance changes of cytochromes and other pigments in pea chloroplasts and chloroplast fragments.
Arch. Biochem. Biophys. 153, 241-218.

LEWENSTEIN,A. and BACHOFEN,R. (1972):
Transient induced oscillations in the level of ATP in Chlorella fusca.
Biochim. Biophys. Acta 267, 80-85.

LÖPPERT,H.G. und BRODA,E. (1973):
ATP-Gehalt und ATP-Umsatz von Chlorella in Abhängigkeit von Belichtung und Belüftung.
Z. für allg. Mikrobiol. 13, 499-506.

LORENZEN,H. (1970):
Synchronous cultures.
In: Photobiology of Microorg., Halldal,O. ed., Willey London, 1970, 187-212.

LORENZEN,H. and HESSE,M. (1974):
Synchronous cultures.
In: Algae Physiol. and Biochemistry, Stewart, W.D.P. ed., 1974, 894-908.

LYNN,W.S. and STRAUB,K.D.(1969):

Isolation and properties of a protein from chloroplasts required for photophosphorylation and H^+-uptake.

Biochemistry 8,4789.

LYNN,W.S. and STRAUB,K.D.(1969):

ADP-kinase and ATP-ase in chloroplasts.

Proc.Nat.Acad.Sci. 63, 540-547.

Mc KINNEY,G.(1941):

Absorption of light by chlorophyll solutions.

J.Biol.Chem. 140,315-322.

MAISON-PETERI,B. and ETIENNE,A.L.(1977):

Effects of sodium azide on photosystem II of Chlorella pyrenoidosa.

Biochim.Biophys.Acta 459,10-19.

MAXWELL,P.C. and BIGGINS,J.(1976):

Role of cyclic electrontransport in photosynthesis as measured by the photoinduced turnover of P_{700} in vivo.

Biochemistry 15,3975-3981.

MEHLER,A.H.(1951):

Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and Hill-reagents.

Arch. Biochem. Biophys. 33,65-67.

MELL,V.(1974):
Herstellung subzellulärer, photosynthetisch aktiver Chloroplastenpartikel aus einzelligen Grünalgen.
Staatsexamensarbeit, Marburg.

MIGINIAC-MASLOW,M. and MOYSE,A.(1969):
Some features of the photophosphorylation of isolated intact chloroplasts.
Proc.Int.Congr.Photosynth.Res. 1st 1969, 1203-1212.

MITCHELL,P.(1961):
Coupling of photophosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type of mechanism.
Nature 191,144-148.

MITCHELL,P.(1974):
A chemiosmotic molecular mechanism for proton-translocating adenosin triphosphatase.
FEBS LETT. 43,189-194.

MITCHELL,P.(1975a):
Promotive redoxmechanism of the cytochrome b-c_1 complex in the respiratory chain: promotive ubiquinone cycle.
FEBS LETT. 56,1.

MITCHELL,P.(1975b):
The promotive Q-cycle: a general formulation.
FEBS LETT. 59,137-141.

NELSON,N.,NELSON,H.,NAIM,Y. and NEUMANN,J.(1971):
Effect of pyridine on the light-induced pH-rise and post illumination ATP-synthesis in chloroplasts.
Arch. Biochem. Biophys. 145,263-267.

NELSON,N.(1976):
Structure and function of chloroplast ATP-ase.
Biochim.Biophys.Acta, 456,314-338.

NEUMANN,J.,ARNTZEN,CH.J. and DILLEY,R.A.(1971):
Two sites for adenosin triphosphate formation in photosynthetic electrontransport mediated by PS I. Evidence from digitonin subchloroplast particles.
Biochemistry 10,866-873.

NICHOLLS,D.G.,SHEPHARD,D. and GARLAND,P.B.(1967):
A continous recording technique for the measurement of carbondioxide and its application to mitochondrial oxidation and decarboxylation reactions.
Biochem. J. 103,677.

NULTSCH,W. and BAI,I.(1966):
Untersuchungen über den Einfluß von Photosynthese-hemmstoffen auf das phototaktische und photokinetische Reaktionsverhalten blaugrüner Algen.
Z. Pfanzenphys. 54,84-98.

MULTSCH,W. (1967):
Untersuchungen über den Einfluß von Entkopplern auf die Bewegungsaktivität und das Reaktionsverhalten blaugrüner Algen.
Z. Pflanzenphysiol. 56, 1-11.

OETTMEIER,W.; REIMERS,S. and TREBST,A. (1974):
Substituted indamines as electron donors in photoreduction by PS I.
Plant Sci. Lett. 2, 267-271.

OKKEH,A. and KYLIN,A. (1975):
The ATP-levels obtained in photophosphorylation, glycolysis and oxidative phosphorylation in Scenedesmus titrated with desaspidine.
Physiol. Plant. 33, 118-124.

OKKEH,A.; TILLBERG,J.E. and KYLIN,A. (1975):
The effect of light intensity on total phosphorylation and ATP-level in Scenedesmus.
Physiol. Plant. 33, 124-128.

ORT,D.R. and DILLEY,R.A. (1976):
Photophosphorylation as a function of illumination time I. Effects of permanent cations and permanent anions.
Biochim. Biophys. Acta 449, 95-107.

ORT,D.R.; DILLEY,R.A. and GOOD,N.E. (1976):
Photophosphorylation as a function of illumination time II. Effects of permanent buffers.
Biochim. Biophys. Acta 449, 108-124.

PATTERSON,C.O.P. and MYERS,J.(1973):
Photosynthetic production of hydrogen peroxide by Anacystis nidulans.
Plant Physiol. 51,104-109.

PIRSON,A. and LORENZEN,H.(1966):
Synchronized dividing algae.
Ann.Rev.Plant.Physiol. 17,439-458.

QUITRAKUL,R. and IZAWA,S.(1973):
Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor. II. Acceptor-specific inhibition by KCN.
Biochim.Biophys.Acta 305,105-118.

REEVES,S.G. and HALL,D.O.(1978):
Photophosphorylation in chloroplasts.
Biochim.Biophys.Acta 463,275-299.

ROBERTSON,R.N. and BOARDMAN,N.K.(1975):
The link between charge separation, proton movement and ATP-ase reactions.
FEBS LETT. 60,1-6.

ROTTENBERG,H.,GRUNEWALD,T. and AVRON,M.(1972):
Determination of ΔpH in chloroplasts.
I. Distribution of (^{14}C)-Methylamine.
Europ. J.Biochem. 25,54-63.

RUMBERG,B. and MUHLE,H.(1975):
Investigations of the kinetics of proton translocation across the thylakoid membrane.
Bioelectrochemistry and Bioenerg. 3,393-403.

SAHA,S.,QUITRAKUL,R.,IZAWA,S. and GOOD,N.E.(1971):
Electrontransport and photophosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor.
J. Biol. Chem. 246,3204-3209.

SANTARIUS,K.A. and HEBER,U.(1965):
Changes in the intercellular levels of ATP, ADP,AMP and regulatory function of the adenylate system in leaf cells during photosynthesis.
Biochim.Biophys.Acta 102,39-51.

SCHACTER,B.Z.,GIBBS,M. and CHAMPIGNY,M.L.(1971):
Effect of antimycin A on photosynthesis of intact spinach chloroplasts.
Plant Physiol. 48,443-446.

SCHACTER,B.Z. and BASSHAM,J.A.(1972):
Antimycin A stimulation of rate-limiting steps of photosynthesis in isolated spinach chloroplasts.
Plant Physiol. 49,411-416.

SCHÄFER,M.(1975):
ATP-Pool-Bestimmungen und Konformationsänderungen während des Entwicklungsverlaufes von Scenedesmus obliquus in Synchronkulturen.
Dissertation, Marburg.

SCHLIEPHAKE,W.,JUNGE,W. and WITT,H.T.(1968):
Correlations between field formation, proton translocation and the light reactions in photosynthesis.
Z. Naturforsch. 23b,1571-1578.

SCHOR,S.,SIEKEVITZ,P. and PALADE,G.E.(1970):
Cyclic changes in thylacoid membranes of synchronized Chlamydomonas reinhardii.
Proc.Nat. Acad.Sci. 66,174-180.

SCHRAM,E.,CORTENBOSCH,R.,GERLO,E. and ROOSENS,H.(1971):
Application of scintillation counters to the assay of bioluminescence.
In: Org. Scintillators and Liquid Scintillation Counting, Horricks and Peny eds.,125-135.

SCHREIBER,U. and VIDAVER,W.(1974):
Chlorophyll fluorescence induction in anaerobic Scenedesmus obliquus.
Biochim.Biophys.Acta 368,97-112.

SCHRÖDER,H.,MUHLE,H. and RUMBERG,B.(1972):
Relationship between ion transport phenomena and phosphorylation in chloroplasts.
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd 1972, 918-930.

SCHULDINER,S.,ROTTENBERG,H. and AVRON,M.(1972):
Determination of Δ pH in chloroplasts.
2. Fluorescent amines as a probe for the determination of ΔpH in chloroplasts.
Europ. J. Biochem. 25,64-70.

SCHÜRMANN,P.,BUCHANNAN,B.B. and ARNON,D.I.(1971):
Role of cyclic photophosphorylation in photosynthetic carbon dioxide assimilation by isolated chloroplasts.
Biochim.Biophys.Acta 267,111-124.

SELLAMI,A. (1976):

Evolution des adénosine phosphates et de la charge énergétique dans les compartiments chloroplastique et nonchloroplastique des feuilles de blé.

Biochim. Biophys. Acta 423, 524-539.

SELMAN,B.R. and BANNISTER,T.T. (1972):

Trypsin inhibition of photosystem II-electron transport.

Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd 1972, 577-586.

SELMAN,B.R. and ORT,D.R. (1977):

Oxidation-reduction coupled phosphorylation in the dark with isolated spinach chloroplasts.

Biochim. Biophys. Acta 460, 101-112.

SENGER,H. (1968):

Änderungen im Photosynthesemechanismus während des Entwicklungszyklus synchron wachsender Grünalgen.

Habilitationsschrift der Naturwisscenschaftlichen Fakultät der Universität Marburg.

SENGER,H. (1970):

Quantenausbeute und unterschiedliches Verhalten der beiden Photosysteme des Photosynthese-apparates während des Entwicklungsablaufes von Scenedesmus obliquus in Synchronkulturen.

Planta 22, 327-346.

SENGER,H. and FRICKEL-FAULSTICH,B.(1974):
The regulation of electron flow in synchronized cultures of green algae.
Proc.Int.Congr.Photosynth.Res.3rd 1974,715-727.

SENGER,H. (1975):
Changes in photosynthetic activities in synchronous cultures of Scenedesmus, Chlorella and Chlamydomonas.
Les Cycles Cellulaires et leurs Blocages, publ. C.N.R.S., Paris 1975

SENGER,H. and MELL,V. (1976):
Preparation of photosynthetically active particles from synchronized green algae.
In: Methods in Cell Physiol. Prescott,M.D. ed., Vol.XII, Acad. Press New York, 201-220.

SENGER,H. (1978):
Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of Chlamydomonas reinhardii.
In: Methods in Enzymol., San Pietro,A.ed., in print.

SIMONIS,W. (1964):
Untersuchungen zur Photophosphorylierung an intakten Algenzellen.
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 77, 5-13.

SIMONIS,W. and URBACH,W. (1973):
Photophosphorylation in vivo.
Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 89-114.

SLATER,E.C. (1953):

Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain.

Nature 172, 975-982.

SLATER,E.C. (1967):

An evaluation of Mitchell-hypothesis of chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.

Europ. J. Biochem. 1, 317-326.

SLOVACEK,E.R. and HIND,G. (1977):

Influence of Antimycin A and uncouplers on anaerobic photosynthesis in isolated chloroplasts.

Plant Physiol. 60, 538-542.

STANLEY,P.E. and WILLIAMS,S.G. (1969):

Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosin triphosphate by the Luciferase enzyme.

Analyt. Biochem. 29,381-392.

STIEHL,H.H. and WITT,H.-T. (1969):

Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis.

Z. Naturforsch. 24b, 1588-1598.

STREHLER,B.(1970):

Adenosin-5-triphosphat und Creatinphosphatbestimmung mit Luciferase.

In: Methoden der Enzym. Analyse, Bergmeyer,H.U. ed., Verlag Chemie, Weinheim, 2036-2045.

STROTMANN,H. und v.GÖSSELN,CH.(1972):
Photosystem I abhängige Phosphorylierung isolierter Chloroplasten mit Ascorbat/ 2.6.-Dichlorphenolindophenol als Elektronendonator und Methylviologen als Elektronenakzeptor. Z. Naturforsch. 27b,445-455.

SUNDBERG,I.,TILLBERG,J.E. and BJÖRKLUND,G.(1976):
Effects of DBMIB on light induced and glycolytic phosphate uptake in Scenedesmus. Physiol. Plant. 38,141-146.

TAGAWA,K.,TSUJIMOTO,H.Y. and ARNON,D.I.(1963):
Role of chloroplast ferredoxin in the energy conservation process of photosynthesis. Proc.Nat.Acad.Sci. 49,567-572.

TAMIYA,H.(1964):
Growth and cell division in Chlorella. In:Synchrony in cell division and growth. Zeunth,E. ed., Interscience, New York 247-305.

TANNER,W.,DÄCHSEL,L. and KANDLER,O.(1965):
Effects of DCMU and antimycin A on photoassimilation of glucose in Chlorella. Plant Physiol. 40,1151-1156.

TANNER,W.,LOCS,E. and KANDLER,O.(1966):
Glucose assimilation of Chlorella in monochromatic light of 658 and 711 nm. In: Currents in Photosynthesis, Thomas,J.B. and Goedheer,J.C. eds., Rotterdam, 243-251.

TANNER,W.,LÖFFLER,M. and KANDLER,O.(1969):
Cyclic photophosphorylation in vivo and its relation to photosynthetic CO_2-fixation.
Plant Physiol. 44,422-428.

TREBST,A.,HARTH,E. and DRABER,W.(1970):
On a new inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts.
Z. Naturforsch. 25b,1157-1159.

TREBST,A. and REIMERS,S.(1973):
Properties of photoreduction by PS II in isolated chloroplasts. An energy-conserving step in the photoreduction of p-Benzoquinone by PS II in the presence of DBMIB.
Biochim.Biophys.Acta 305,129-139.

TREBST,A.(1974):
Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts.
Ann.Rev.Plant Physiol. 25,423-458.

TREBST,A.(1975):
Electron flow across the thylakoid membrane. Native and artificial energy conserving sites in photosynthetic electron flow.
Proc.Int.Congr.Photosynth.Res. 3rd 1974,439-448.

ULLRICH,W.R. und SIMONIS,W.(1969):
Die Bildung von Polyphosphaten bei Ankistrodesmus braunii durch Photophosphorylierung im Rotlicht von 683 und 712 nm unter Stickstoff.
Planta 84, 358-367.

ULLRICH,W.R.(1972):

Comparative estimation of cyclic and non-cyclic photophosphorylation in N_2 by Ankistrodesmus braunii in vivo.

Proc.Int.Congr.Photosynth.Res. 2nd 1972,1328-1335.

ULLRICH,W.R.(1971):

Nitratabhängige nichtzyklische Photophosphorylierung bei Ankistrodesmus braunii in Abwesenheit von CO_2 und O_2.

Planta 100,18-30.

URBACH,W. und GIMMLER,H.(1970a):

Das Verhalten der zyklischen und nichtzyklischen Photophosphorylierung während des Entwicklungszyklus von Ankistrodesmus braunii.

Ber.Dtsch.Bot.Ges. 83,439-442.

URBACH,W. und GIMMLER,H.(1970b):

Photophosphorylierung und photosynthetische $^{14}CO_2$-Fixierung in vivo.

Z. Pflanzenphysiol. 62,276-286.

URBACH,W. and KAISER,W.(1972):

Changes of ATP-levels in green algae and intact chloroplasts by different photosynthetic reactions.

Proc.Int.Congr.Photosynth.Res. 2nd 1972,1401-1411.

WALKER,D.A.(1976):

CO_2-fixation by intact chloroplasts: photosynthetic induction and its relation to transport phenomena and control mechanisms.

In: Topics in Photosynthesis Vol. I, The intact chloroplast, Barber,J. ed., Elsevier Sci.Publ.Co., Amsterdam, 235-278.

WERDAN,K., HELDT,H.W. and MILOVANCEV,M.(1975):
The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO_2-fixation in the light and dark.
Biochim.Biophys.Acta 396,276-292.

WIESSNER,W.(1970):
Photometabolism of organic substrates.
In: Photobiology of Microorg., Halldal,P. ed., Interscience, London, 95-133.

WILLIAMS,R.J.P.(1969):
Electron transfer and energy conservation.
In: Current Topics of Bioenerg.,79-156.

WILLIAMS,R.J.P.(1975):
Proton driven phosphorylation reactions in mitochondrial and chloroplast membranes.
FEBS LETT. 53,123-125.

WITT,H.T.,SCHLODDER,E. and GRÄBER,P.(1976):
Membrane-bound ATP synthesis generated by an external electrical field.
FEBS LETT. 69,272-276.

YAMASHITA,T. and BUTLER,W.L.(1968a):
Photoreduction and photophosphorylation with tris-washed chloroplasts.
Plant Physiol. 43,1978-1986.

YAMASHITA,T. and BUTLER,W.L.(1968b):
Inhibition of chloroplasts by UV-irradiation and heat treatment.
Plant Physiol. 43,2037-2040.

YAMASHITA,T.,KONISHI,K.,ITOH,M. and SHIBATA,K.(1969):
Photo-bleaching of carotenoids related to the electron transport in chloroplasts.
Biochim.Biophys.Acta 172,511-524.

YOCCUM,C.F.(1977a):
Photophosphorylation associated with PS II. II. Effects of electrondonors catalyst oxidation and electron transport inhibitors on PS II cyclic photophosphorylation.
Plant Physiol. 60,592-596.

YOCCUM,C.F.(1977b):
Photophosphorylation associated with PS II. III. Characterization of uncoupling, energy transfer inhibition, and proton uptake reactions associated with PS II cyclic photophosphorylation.
Plant Physiol. 60,597-601.

Die vorliegende Arbeit entstand am Fachbereich Biologie-Botanik der Philipps-Universität Marburg/Lahn.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof.Dr. H.Senger für die Themenstellung sowie die Betreuung und großzügige Förderung der Arbeit danken.
Mein Dank gilt ebenfalls:
Frau G. Müller, Frau H. Maus und Frau I. Koss für die Betreuung der Algenkulturen,
Frau C.Jeske und Frau Ch. Pretzsch für die Durchführung einiger Photosynthese-Experimente, insbesondere Frau I. Krieger, jedoch auch Frau C. Jeske und Herrn G. Brinkmann für ihren Einsatz bei der schriftlichen Fixierung und dem Korrekturlesen der Arbeit, schließlich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe H. Senger, sowie den Angehörigen des Fachbereichs Biologie, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben.

Diese Arbeit wurde durch Mittel des Sonderforschungsbereichs 103 der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert, der an dieser Stelle ebenfalls gedankt sei.

Meine akademischen Lehrer waren:
Ax, Bergmann, Bertsch, Birukow, Bock, Bohle,
Brockmann, Buchholtz, Ellenberg, Geyer, Glemser,
Heberer, Henßen, Hirsch, Koch, Koecke, Lenski,
Lorenzen, Luther, Meyer Ed., Nöth, Nultsch, Pfeil,
Piepho, Pirson, Remane, Rensing, Runge, Schlote,
Scriba, Senger, Wagenitz, Werner, Wiessner.

LEBENSLAUF

18.2.1950	geboren in Oberkaufungen als Tochter des Leistungsinspektors Karl Kirschstein und seiner Frau Magdalena geb. Müller
1956-1960	Besuch der Volksschule in Oberkaufungen
1960-1968	Besuch des Gymnasiums Engelsburg in Kassel bis zum Abitur
WS 1968	Studium der Biologie und Chemie an der Philipps-Universität Marburg
SS 1969- SS 1971	Studium derselben Fächerkombination an der Georg-August-Universität Göttingen
WS 1971	Fortsetzung des Studiums in Marburg
Jan. 1975	Wissenschaftliche Prüfung für das höhere Lehramt (Staatsexamen)
Apr. 1975- Apr. 1978	Wissenschaftliche Angestellte am Botanischen Institut der Philipps-Universität Marburg und Anfertigung einer Dissertation